GRUNDPRAKTIKUM PHYSIOLOGIE

TEIL: „PFLANZENPHYSIOLOGIE“

BIOLOGIE

Universität des Saarlandes

Sommersemester 2008







TITELBILD

Arabidopsis thaliana ist eine kleine Blütenpflanze und ein viel genutzter Modellorganismus in der Pflanzenbiologie. Arabidopsis zählt zur Familie der Brassicaceen (Kreuzblütler, Senfgewächse), welcher auch Kulturpflanzen wie Kohl und Raps angehören. Arabidopsis hat zwar keine agronomische Bedeutung, aber bietet wichtige Vorteile für die Genetik und Molekularbiologie in der Grundlagenforschung. Weitere Informationen unter http://www.arabidopsis.org/info/aboutarabidopsis.jsp.

INHALTSVERZEICHNIS

A. WICHTIGE INFORMATIONEN ZUM PRAKTIKUM

Termine:

Das Praktikum findet in Nachmittagskursen ab 13.00 s.t. statt. Der praktische Teil wird im Kursraum 1.01 Botanik, Gebäude 6, 1. OG durchgeführt. Treffpunkt: jeweils im Seminarraum neben dem Kursraum.
Alle Termine werden im Zeitplan bekannt gegeben.

Benötigte Schreib- und Arbeitsutensilien, die von jedem/jeder Teilnehmer/in mitgebracht werden müssen:

Präparierbesteck, Schere, wasserfester schwarzer Marker zum Beschriften, Taschenrechner, Bleistift, kariertes Laborheft zur Protokollierung (keine losen Blätter), Laborkittel.

Sicherheitsregeln:

- Beim Arbeiten im Laborbereich sind grundsätzlich **Laborkittel** zu tragen.
- Beim Arbeiten mit Säuren und Laugen sowie organischen Lösungsmitteln ist eine **Schutzbrille** zu tragen.
- Beim Pipettieren von allen Flüssigkeiten **unbedingt** Peleus-Ball oder andere Pipettierhilfe benutzen, **niemals mit dem Mund pipettieren**!
- Im Kursraum sind Rauchen, Essen und Trinken **grundsätzlich** verboten.
- Die Sicherheitsregeln werden besprochen und sind von allen TeilnehmerInnen zur Kenntnisnahme zu unterschreiben.

Vorbereitung der Versuche im Laborheft (VOR DEM PRAKTIKUM):

Die jeweils durchzuführenden Versuche müssen gründlich vorbereitet sein. Es ist wichtig, dass Sie die theoretischen Grundlagen und Anleitung nicht nur **vor dem Praktikumstag** lesen sondern auch verstehen. Sie sollten bei der Vorbereitung die Versuchsdurchführung mitplanen. Dies bedeutet:

1. **Erstellen Sie vor dem Praktikumstag gruppenweise eine Arbeitsskizze (Ziel und grobe Durchführung).**

2. **Erarbeiten Sie gruppenweise bereits vor dem Praktikum einen Zeitplan für die Versuche**, d.h. wie die Teilversuche sinnvoll verschachtelt werden können, um die Praktikumszeit effizient auszunutzen. Die Reihenfolge der Teilversuche stellt nicht unbedingt eine chronologische Anleitung dar.
3. Bei einigen Teilversuchen müssen praktische Berechnungen vorab erledigt werden, d.h. **erstellen Sie Verdünnungsschemen und andere Berechnungen gruppenweise bereits vor dem Praktikumstag**, wie angegeben.
4. **Machen Sie sich Gedanken, wie die Ergebnisse am sinnvollsten dargestellt werden können**, z.B. in Tabellenform, als Graph, etc.

Diese vier Punkte sollten Sie in Ihrem Laborheft vor dem Praktikum schriftlich festhalten, um bei der Besprechung mit den BetreuerInnen optimal vorbereitet zu sein.

Protokollierung der Versuchsabläufe im Laborheft (WÄHREND DES PRAKTIKUMS):

Zu jedem Versuch ist **während** des Praktikums ein Protokoll im Laborheft zu führen. Dieses Protokoll soll Ihnen später helfen, die Versuchsabläufe nochmals zu rekonstruieren und die Ergebnisse auszuwerten. Wichtig ist, dass Sie alle wesentlichen Arbeitsschritte, Ergebnisse, Beobachtungen und mögliche Abweichungen von der Anleitung schriftlich festhalten. Daher sollte das Protokoll in chronologischer Reihenfolge die Arbeitsschritte und Ergebnisse enthalten. Ein ordentlich geführtes Protokoll in gebundenem Laborbuch dient in der Forschung nicht nur als Hilfe für die spätere Dokumentation, sondern kann auch ein wichtiger Beweis sein, um die eigene Arbeitsleistung und die eigenen Ergebnisse an bestimmten Arbeitstagen nachweisen zu können.

Das Laborheft sollte mindestens folgende Informationen enthalten:

(Vorbereitung vor dem Praktikum, Stichworte und Skizzen):

Datum:

Versuchstitel:

Titel der Teilversuche mit grober Skizze zu Ziel und Durchführung:

Zeitplan:

Vorabberechnungen (Verdünnungsschemen, etc.):

Notizen zur Darstellung der späteren Ergebnisse:

(Protokoll während des Praktikums):

Beschreibung der Arbeitsschritte und wesentlichen Details mit Angabe der Nummer der Teilversuche in chronologischer Reihenfolge, ggf. mit Uhrzeit, Abweichungen von der Praktikumsanleitung unbedingt notieren. Informationen der Betreuer/-innen zur Vorbereitung des Versuchs ebenfalls festhalten, z.B. Pflanzenanzuchtbedingungen. Sie können darüber hinaus alles aufschreiben und zeichnen, was Ihnen wichtig erscheint.

Ergebnisse der Teilversuche (Zahlen, Tabellen, Zeichnungen, etc.)

Ihre **Beobachtungen und kurze Schlußfolgerung**

Weiterführende Literatur zur Kursthematik:

Campbell, E.A. 2003. Biologie. 6. Auflage, Spektrum.
Hess, D. 1999. Pflanzenphysiologie. 10. Auflage, Ulmer.
Kutschera, U. 1998. Grundpraktikum zur Pflanzenphysiologie. Quelle & Meyer.
Lüttge, U., Kluge, M., Bauer, G. 1999. Botanik. 3. Auflage, Wiley-VCH.
Mengel, K. 1991. Ernährung und Stoffwechsel der Pflanze. 7. Auflage, Fischer.
Nultsch, W. 1996. Allgemeine Botanik. 10. Auflage, Thieme.
Richter, G. 1998. Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. 6. Auflage, Thieme.
Schopfer & Brennecke 1999. Pflanzenphysiologie. 5. Auflage, Springer.
Taiz & Zaiger 2002. Plant Physiology. 3. Auflage, Sinauer.

Auswertung und Versuchsbericht (NACH DEM PRAKTIKUM):

Die Ausarbeitung des Versuchsberichts erledigen Sie bitte am Ende oder nach dem Praktikum. Forschungsergebnisse werden in der Regel schriftlich veröffentlicht. Ganz ähnlich sollten Sie Ihren Versuchsbericht aufbauen. Einen Vorschlag finden sie unten. Den Versuchsbericht verfassen Sie bitte auf Blättern mit Seitenangaben und liefern ihn den jeweiligen BetreuerInnen zum Beispiel im Hefter ab. Der Termin für die letztmögliche Abgabe von Versuchsberichten wird bei der Vorbesprechung gewählt. Die Ausarbeitung des Versuchsberichts ist eine sinnvolle Klausurvorbereitung!

Bei der Angabe von **Zahlenwerten** ist darauf zu achten, nicht mehr signifikante Stellen anzugeben als reproduzierbar sind.
Bei **Kurvendarstellungen** sollte in der Auswertung das Zeichenpapier (Millimeterpapier) möglichst vollständig ausgenutzt werden. Gleichzeitig sollten die Darstellungen aber in vernünftigen Maßstabsverhältnissen gezeichnet und das Format so gewählt werden, dass genügend Platz zum Anbringen der Koordinaten bleibt. Diese sind stets eindeutig mit Messgröße und deren Benennung zu versehen.
Ebenso unmissverständlich muss auch eine darüber hinausgehende Beschriftung von Abbildungen sein. Tabellen und Abbildungen sind grundsätzlich mit **Titel und Legenden** zu versehen, so dass die zugehörigen Tabellen bzw. Abbildungen für fremde Leser ohne Zuhilfenahme des Textes verständlich sind.
Abbildungen. und Tabellen nummerieren Sie bitte durch und verweisen im Text darauf.

<u>Versuchsbericht</u>

Datum:

Versuchstitel:

Name:

Hintergrund und Ziel (ca. ½ Seite): nur theoretische Hintergrundinformationen, um das Ziel des Versuchs zu verstehen

Ergebnisse: Versuchsablauf und Ergebnisse (keine Details zu Methoden und Material, wie sie in Anleitung und Protokoll stehen). Alle Ergebnisse in leicht verständlicher Form in Tabellen oder Abbildungen präsentieren, ggf. mit statistischer Auswertung.

Diskussion: Die Versuchsergebnisse entsprechend der Aufgabenstellung kritisch interpretieren. Mögliche Fehlerquellen sind aufzuzeigen und die Ergebnisse in den Rahmen des etablierten Wissens einzuordnen, d.h. mit Erwartungs- und Literaturwerten zu vergleichen.

Formal:
- **zweizeilig**
- **5 cm breiter rechter Rand einseitig bedruckt**
- Computer erstellt; Graphiken können auch per Hand auf Millimeterpapier gezeichnet werden

Der in Veröffentlichungen übliche Material- und Methodenteil kann wegfallen.

B. VERSUCHE

Versuch I

PHOTOSYNTHESEPIGMENTE

Zur Thematik des Versuchs siehe:
Campbell, S. 209-231; Lüttge et al. S. 119-143; Mengel, S. 64-85; Nultsch, S. 281-311; Richter, S. 67-199.

Versuch I/1:
DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG DER CHLOROPLASTENFARBSTOFFE AUS FRISCHEN EFEUBLÄTTERN

a) Theoretische Grundlagen:

Eine Auftrennung der photosynthetisch aktiven Blattfarbstoffe in die Einzelpigmente ist mit chromatographischen Methoden zu erreichen. Hierzu müssen sie zunächst mit organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Alkohol u.ä. aus dem Blattmaterial extrahiert werden. Nach Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen (Filtration oder Zentrifugation) liegt eine grüne Lösung vor, die die verschiedensten Blattinhaltsstoffe enthält. Dieser Rohextrakt kann direkt der Chromatographie unterworfen werden.
Unter Chromatographie versteht man physikalische Verfahren zur Stofftrennung, bei denen das zu untersuchende Stoffgemisch mit Hilfe einer Flüssigkeit oder eines Gases - der beweglichen oder mobilen Phase - an einem festen oder flüssigen Stoff mit großer Oberfläche - der ruhenden oder stationären Phase - vorbeigeführt wird. Eine Trennung der einzelnen Substanzen des Gemischs tritt dadurch ein, dass diese in verschiedenem Ausmaß zurückgehalten werden und so verschieden schnell durch das zweiphasige System wandern.
Entsprechend ihrer Eigenschaften können verschiedenartige Substanzen in kleinsten Mengen aus Geweben isoliert, mit fluoreszierenden Stoffen ggf. gekoppelt und durch Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) verbunden mit entsprechenden (Fluoreszenz-) Detektoren aufgetrennt werden (anwendbar für Metabolite, Peptide, DNA). Im Anschluss kann eine Identifizierung durch massenspektrometische Methoden

erfolgen. Bei automatisierten Verfahren, wie sie heute häufig angewendet werden, ist der Durchsatz enorm.

Nach Art der Kräfte, die während des chromatographischen Prozesses zur Trennung der Substanzen führen, unterscheidet man zwischen:

a) Adsorptionschromatographie

b) Verteilungschromatographie

c) Ionenaustauschchromatographie

d) Ausschlusschromatographie

Die meisten chromatographischen Verfahren beruhen auf den beiden Prinzipien Adsorption und Verteilung. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

Adsorption nennt man allgemein die Anreicherung eines Stoffes an die Oberfläche eines anderen, meist festen Stoffes, der auch als Adsorptionsmittel oder Sorbens bezeichnet wird. Die Stofftrennung durch Adsorptionschromatographie beruht auf vielfach wiederholter Adsorption und Desorption der zu trennenden Stoffe an der Oberfläche eines Adsorptionsmittels. Hierzu kommt es, wenn ein Substanzgemisch mit Hilfe einer flüssigen oder gasförmigen mobilen Phase durch die Schicht des Adsorptionsmittels als stationärer Phase geführt wird. Es bildet sich für jede einzelne Komponente des Gemischs ein Adsorptionsgleichgewicht aus. Resultiert daraus eine unterschiedliche Adsorption für zwei Substanzen an der festen stationären Phase, so wandern diese verschieden schnell und werden getrennt.

Die stationäre Phase bilden Sorbentien wie z.B. Calciumcarbonat, Kieselgel oder Aluminiumoxid. Ist die mobile Phase flüssig, so handelt es sich meist um ein organisches Lösungsmittel, das auch als Fließmittel oder Elutionsmittel bezeichnet wird. Für ein solches System gilt allgemein: leicht adsorbierbare und schwer eluierbare Stoffe wandern langsamer, schwer adsorbierbare und leicht eluierbare Stoffe dagegen schneller.

Die **Adsorptionschromatographie** wurde erstmals von dem russischen Botaniker TSWETT im Jahre 1906 angewandt. Er ließ einen Petroleumbenzinextrakt aus grünen Blättern durch ein mit Calciumcarbonat gefülltes Glasrohr (Säule) laufen und beobachtete, dass sich der anfangs einheitliche Extrakt in mehrere grün und gelb gefärbte Zonen aufgliederte (Chromatographie: chroma, chromatos (gr.): Farbe; graphein (gr.): schreiben; historisch gesehen also „Farbschreiben“). TSWETT fand auf diese Weise die beiden Chlorophylle a und b. Zu Anfang der dreißiger Jahre gelang es mit dieser Methode, eine Reihe von Carotinoidfarbstoffen in präparativem Maßstab zu isolieren, so u.a. α- und β-Carotin. Zu Beginn der sechziger Jahre wurde die

Adsorptionschromatographie in Form der Dünnschichtchromatographie zu einem neuen, vorwiegend in der Analytik verwendeten Verfahren weiterentwickelt (Übergang von der „geschlossenen“ zur „offenen“ Säule).

Die **Verteilungschromatographie** beruht auf der unterschiedlichen Verteilung der zu trennenden Substanzen zwischen zwei nicht oder nur begrenzt mischbaren flüssigen Phasen. Grundlage dieses Trennverfahrens ist das Nernstsche Verteilungsgesetz. Es besagt, dass in einem System aus zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten das Verhältnis der Konzentration eines gelösten Stoffes in den beiden Flüssigkeitsphasen im Gleichgewichtszustand eine Konstante ist, sofern die Temperatur unverändert bleibt. Mathematisch wird das Gesetz wie folgt formuliert:

$$K = \frac{C_1}{C_2} = \text{konstant}$$

C_1 und C_2 sind die Gleichgewichtskonzentrationen des Stoffes in der ersten und zweiten Phase. Die Konstante K wird Verteilungskoeffizient genannt.

Substanzen mit verschiedenen Verteilungskoeffizienten für ein zweiphasiges Lösungsmittelsystem reichern sich also unterschiedlich in einer Phase an. Diese Tatsache wird in der Praxis beim Ausschütteln von gelösten Substanzen ausgenutzt. Da organische Substanzen besser in organischen Lösungsmitteln als in Wasser löslich sind, können sie in einem Scheidetrichter aus wässrigen Lösungen durch Ausschütteln mit organischen, in Wasser schwer löslichen Lösungsmitteln extrahiert und so von gut wasserlöslichen Stoffen getrennt werden.

Bei der Verteilungschromatographie handelt es sich um eine kontinuierliche Folge derartiger Ausschüttelungsprozesse. Transportiert die mobile Phase ein Substanzgemisch entlang der stationären Phase, so stellen sich ständig neue Verteilungsgleichgewichte zwischen den beiden nicht miteinander mischbaren Phasen ein (multiplikative Verteilung). Es genügen dabei bereits kleine Unterschiede zwischen den Verteilungskoeffizienten, um zwei Substanzen voneinander zu trennen.

Die stationäre Phase besteht bei der Verteilungschromatographie meist aus Wasser oder anderen polaren Flüssigkeiten, welche als polarer Flüssigkeitsfilm an einer inerten Trägerschicht (= Sorbens) haften. Die Trägerschicht ist **nicht** am Trennprozess beteiligt, sie dient lediglich dazu, die stationäre Phase aufzunehmen. Die mobile Phase (= Solvens) stellt ein mehr oder weniger apolares Lösungsmittel dar. Sie ist so zu wählen, dass sie sich mit der stationären Phase nicht mischt, aber die zu trennenden Substanzen noch lösen kann. In einem solchen System wandern polare Verbindungen langsamer als

apolare; umgekehrt wandern die Komponenten umso schneller, je besser sie in der mobilen Phase löslich sind.

Als Beispiel einer Verteilungschromatographie dient die im vorliegenden Versuch vorzunehmende dünnschichtchromatographische Trennung der Blattfarbstoffe nach einem Verfahren von HAGER und BERTENRATH (1962). Die Sorptionsschicht der Platte ist ein Gemisch aus Kieselgel, Kieselgur und $CaCO_3$. Das Fließmittel besteht überwiegend aus Petroleumbenzin mit einem Zusatz von Isopropanol und einer Spur Wasser. Bei dieser Kombination bildet wässriges Isopropanol durch Adsorption an das Schichtmaterial (Träger!) die stationäre, das Petroleumbenzin die mobile Phase. Einer polaren stationären wässrigen Alkoholphase steht somit eine apolare mobile Petroleumbenzinphase gegenüber. Die Laufhöhe der Blattpigmente hängt nun von ihrem Löslichkeitsverhalten in diesen beiden Phasen ab. Das apolare sauerstofffreie β-Carotin ist am besten in Petroleumbenzin löslich und wandert deshalb mit der Fließmittelfront durch die Schicht. Die schwach polaren sauerstoffhaltigen Xanthophylle (Lutein, Violaxanthin, Neoxanthin) wandern langsamer und lassen eine Trennfolge erkennen, die der Zahl und der Polarität ihrer sauerstoffhaltigen Gruppen entspricht. Die beiden Chlorophylle lösen sich aufgrund ihres apolaren Phytolrestes relativ gut in der mobilen Phase, Chlorophyll a wandert jedoch wegen der apolaren CH_3-Gruppe im Pyrrolring B etwas weiter als Chlorophyll b, das an der genannten Position eine polare Aldehydgruppe (-CHO) trägt.

Chromatographische Methoden sind in erster Linie Trennmethoden, dienen darüber hinaus aber auch der Isolierung und Identifizierung von Substanzen. Eine dünnschichtchromatographisch getrennte Substanz lässt sich vor allem anhand folgender Kriterien identifizieren: Rf-Wert (Rf = Retentionsfaktor) bzw. Rf-Wert-Reihenfolge, Tageslicht- und Fluoreszenzfarbe, Reaktionen nach Behandlung mit spezifischen Sprühreagenzien. Größere Sicherheit bei der Identitätsbestimmung ist zu erreichen, wenn die abgetrennte Substanz aus der Schicht eluiert und spektroskopisch weiter untersucht wird (vgl. hierzu Versuch I/2): Präparative Dünnschichtchromatographie.

b) Praktische Durchführung:

1. Extraktion:

Efeublätter (*Hedera helix*) ohne Stiele in kleine Stücke reißen und 4 g auf Feinwaage abwiegen (genaues Gewicht mit 2-3 Stellen hinter dem Komma protokollieren!) und in ein Kunststoff-Becherglas geben. Nach Zusatz zweier gehäufter Spatelspitzen $CaCO_3$ (soll Pheophytinbildung durch sauren Zellsaft verhindern!) und 12 ml Aceton werden die Blattstücke im Becherglas mit einem Schnitzelwerk gründlich zerkleinert. Der Überstand des Extraktionsgemischs wird anschließend so vollständig wie möglich durch einen Rundfilter in ein Pillengläschen abfiltriert, das Pillengläschen verschlossen und dunkel, z.B. in der Labortischschublade, aufbewahrt.

2. Dünnschichtchromatographie:

Schicht: Als Masse zum Streichen von 5 Dünnschichtplatten wird eine Suspension aus 12 g Kieselgur G (Merck Nr.8129), 3 g Kieselgel 60 (7729), 3 g $CaCO_3$ (2066) und 0,022 g $Ca(OH)_2$ (zur Neutralisation der Ascorbinsäure!) in 55 ml $8x10^{-3}$ mol/l Ascorbinsäure (Oxidationsschutz für zu trennende Pigmente) benutzt. Nach dem Ausstreichen (Streichdicke: 0,25 mm) werden die Platten bei 60 °C 90 min lang getrocknet und im Exsikkator im Dunkeln aufbewahrt (dadurch soll eine Photooxidation der Ascorbinsäure verhindert werden). Die Dünnschichtplatten werden vom Betreuer des Versuchs vorbereitet und stehen bei Kursbeginn zur Verfügung.

Fließmittel (ml): Petroleumbenzin (Kp 100 - 140 °C)- Isopropanol – H_2O deion. (50 + 6 + 0,125). Zuerst 6 ml Isopropanol und 0,125 ml H_2O deion. (0,2 ml-Pipette) in Erlenmeyerkolben mischen; 50 ml Petroleumbenzin zugeben und mischen. Fließmittel in DC- Kammer geben und diese verschließen (Deckelrand vorher nicht zu dick fetten!).

Auftragen des Extraktes:

DC-Platte nur am oberen Rand anfassen, unterer Rand der Sorptionsschicht darf nicht beschädigt werden. Auftrageschablone mit Graduierung 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt auflegen und mit 5 µl Mikrokapillare 200-250 µl Extrakt in einer 16 cm langen Startbande durch dicht nebeneinander gesetzte Punkte gleichmäßig auftragen (dabei Sorptionsschicht möglichst nicht beschädigen!). Die äußersten Punkte der Startlinie

sollen etwa 2 cm vom linken und rechten seitlichen Plattenrand entfernt sein. Zum Auftragen von 200-250 µl Extrakt wird die Startbande etwa 2x durchlaufen.

Entwicklung des Chromatogramms:

Platte in DC-Kammer stellen, diese verschließen und mit Dunkelschutz versehen; Uhrzeit notieren. Wenn Fließmittelfront ca. 10 cm Steighöhe erreicht hat (i.d.Regel nach 20-30 min), Platte aus der Kammer nehmen, mit eigener Digitalkamera photographieren und dann noch auf der feuchten Platte die Front (direkt oberhalb der β-Carotin-Zone) **sofort** mit Präpariernadel nachziehen; Laufzeit notieren. Danach zunächst die DC-Platte unter einer UV-Lampe bei 366 nm in einer Dunkelkammer betrachten (siehe nächsten Abschnitt!). Anschließend bis auf Chlorophyll a, b und Lutein alle übrigen Pigmentbanden mit Präpariernadel markieren. Danach Chlorophyll a-, Chlorophyll b- und Lutein-Zonen (siehe Musterchromatogramm) **sofort**, wie in Versuch I/2 angegeben, ausschaben. (Chlorophyll **a** = bl**a**ugrün, Chlorophyll **b** = g**elb**grün, Lutein = gelb)

Detektion der Pigmente und Dokumentation:

Bei der Betrachtung der DC-Platte im kurzwelligen Blaulicht (UV-Lampe, 366 nm; Schutzbrille!) fluoreszieren die Chlorophylle a und b rot, die Carotinoide zeigen **keine** Fluoreszenz (Photo Digitalkamera; auch der Gesamtextrakt im Pillengläschen soll auf Fluoreszenz untersucht werden!). Anhand der Rotfluoreszenz auf dem Chromatogramm können mögliche Chlorophyll-Abbauprodukte erkannt werden, z.B. Pheophytin, auf dem Chromatogramm etwas oberhalb von Chlorophyll a.

Zur Dokumentation Chromatogramm mit dünner Glasplatte abdecken, auf Transparentpapier durchzeichnen, Start- und Frontlinie nicht vergessen! Substanzen durch Tageslicht- und Fluoreszenzfarben sowie Rf-Werte kennzeichnen, außerdem Datum, Schicht, Fließmittel, aufgetragenes Extraktionsgemisch und Laufzeit auf dem Dokument vermerken.

Der Rf-Wert ist durch folgenden Quotienten definiert:

$$Rf = \frac{\text{Abstand Mitte der Startlinie – Schwerpunkt der Substanzbande}}{\text{Abstand Mitte der Startlinie – Fließmittelfront}}$$

Rf-Werte liegen zwischen 0 und 1 und werden mit 2 Stellen hinter dem Komma angegeben, **hRf-Werte** sind Rf-Werte x 100 und liegen demnach zwischen 0 und 100.

c) Auswertung:

Die Identifizierung der getrennten Substanzen erfolgt durch vergleichende Methode, d.h. alle zur Charakterisierung der Einzelpigmente erhobenen Daten werden, möglichst in tabellarischer Übersicht, auf Übereinstimmung mit Literaturangaben überprüft. Folgende Identifizierungshilfen sind hierbei zu berücksichtigen: Tageslicht- und Fluoreszenzfarben, Rf-Werte bzw. Rf-Wert-Reihenfolge, Anzahl der getrennten Pigmente sowie deren chemische Natur (Chlorophylle, Carotine, Xanthophylle). Hinsichtlich der Rf-Wert-Reihenfolge wird das eigene Chromatogramm mit einem in einem ähnlichen chromatographischen System (Schicht/Fließmittel) erstellten und dieser Anleitung in Kopie beigefügten Musterchromatogramm (HAGER und BERTENRATH, 1962) verglichen. Sowohl die eigene Schicht als auch die Schicht bei HAGER und BERTENRATH (1962) werden hauptsächlich mit Kieselgur und Kieselgel hergestellt. Seit 1962 haben sich die Herstellungsweise und folglich auch die Herstellungsnummern bei der Firma Merck für Kieselgur und Kieselgel geändert. Dies kann eine veränderte Teilchengröße der beiden Sorbentien und damit eine unterschiedliche Schichtdichte auf der DC-Platte verursachen. Daraus resultieren insbesondere bei den 3 Xanthophyllen deutliche Rf-Wert-Unterschiede zwischen den eigenen Platten und dem bei HAGER und BERTENRATH (1962) abgebildeten Chromatogramm. Vergleichswerte für die Tageslichtfarben der Pigmente sowie das Fluoreszenzverhalten der Chlorophylle sind der Fachliteratur zu entnehmen.

Literatur:

Hager, A. & Bertenrath, T.: Verteilungschromatographische Trennung von Chlorophyllen und Carotinoiden grüner Pflanzen an Dünnschichten.- Planta **58**, 564-568 (1962)

Vergleichschromatogramm zu Versuch I/1

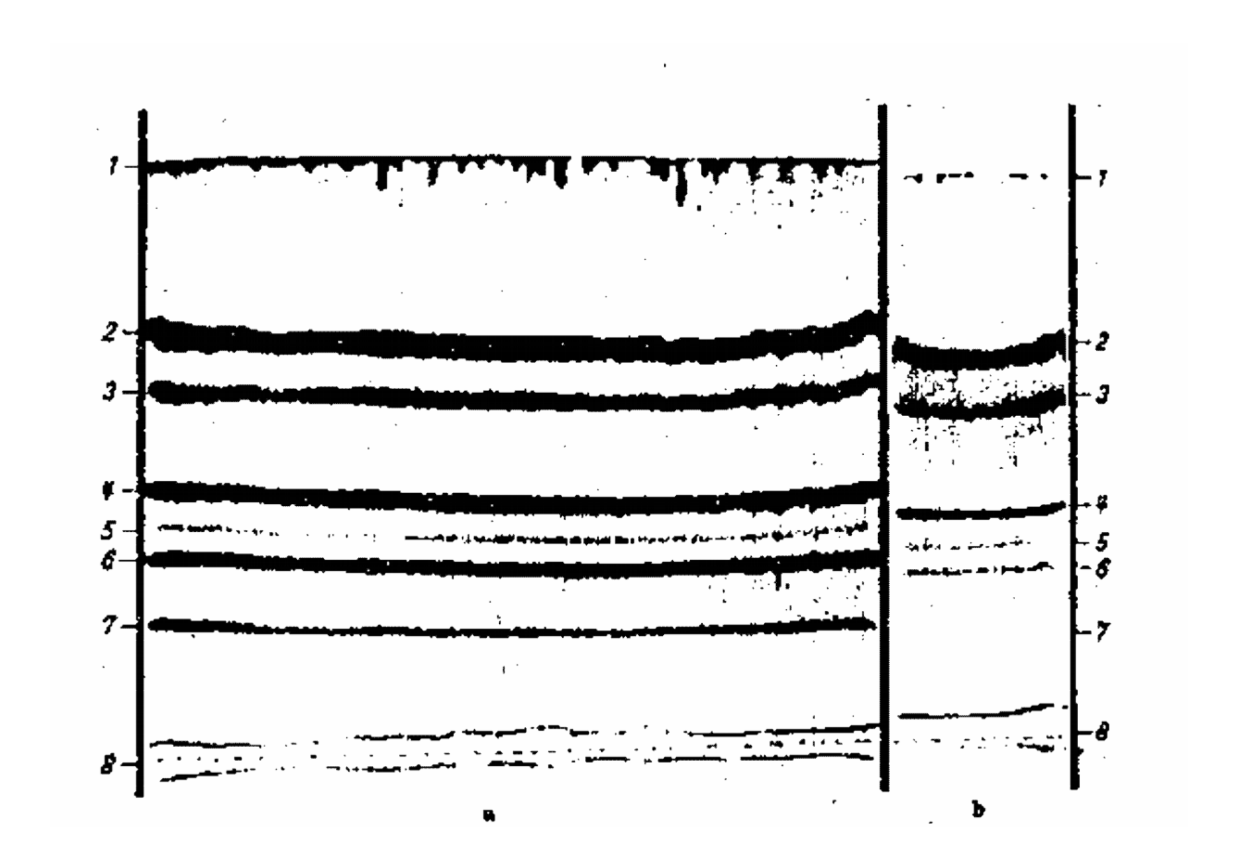


Abb. 2: Dünnschichtchromatogramme (20x20 cm und 20x5 cm; Schichtdicke: 0.25 mm) eines Blattextraktes von *Hedera helix* 30 min nach Beendigung der Trennung; links Dünnschicht (a) mit Ascorbinsäurebeimischung, welche weitgehenden Schutz gegen ein oxidatives Verblassen der Farbstoffe bewirkt. 1 ß-Carotin (an der Front), 2 Chlorophyll a, 3 Chlorophyll b, 4 Lutein, 5 Lutein-5,6-epoxid, 6 Violaxanthin, 7 Neoxanthin, 8 Startlinie (Aus Hager & Bertenrath, 1962)

Hinweis: **Lutein-5,6-epoxid** (Zone **5**) kann bei der Extraktion als Artefakt in **Spuren** entstehen und ist deshalb im Chromatogramm, wenn überhaupt, nur als schwachgelbe Bande erkennbar.

Versuch I/2:

ABSORPTIONSSPEKTREN DER CHLOROPHYLLE A UND B UND DES LUTEINS, ISOLIERT AUS FRISCHEN EFEUBLÄTTERN

a) Theoretische Grundlagen:

Die spezifische Absorption einer Substanz lässt sich mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmen. Dazu wird die Substanz in Lösung gebracht und ihre Fähigkeit zur Lichtabsorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge ermittelt. Die am häufigsten verwendete Messgröße für die Lichtabsorption ist die Extinktion E (vgl. Versuch I/3). Stellt man die gemessenen Absorptions- bzw. Extinktionswerte (Ordinate!) über der zugehörigen Wellenlänge (Abszisse!) in einem Kurvendiagramm dar, so erhält man das Absorptionsspektrum der Substanz. Die Kurvenmaxima (λ_{max}) geben den Wellenlängenbereich an, in dem die Substanz das Licht am stärksten absorbiert. Lage und Intensität der Maxima charakterisieren eine Substanz und erlauben Rückschlüsse auf ihre chemische Struktur.
Die Absorptionsspektren der Chlorophylle sind typische Porphyrinspektren, wie sie auch von den Cytochromen und vom Häm erhalten werden. Die Haupt-Absorptionsmaxima liegen im blauen (430 - 470 nm) und hellroten (640 - 675 nm) Spektralbereich. Grünes Licht (470 - 560 nm) wird nur in geringem Maße, dunkelrotes (700 - 760 nm) gar nicht absorbiert. Wegen der geringen Absorption des grünen Lichtes erscheinen verdünnte Chlorophyll-Lösungen in der Durchsicht grün. Bei starker Konzentration oder bei genügender Schichtdicke der Lösung genügt die geringe Absorption im Grün, um im durchfallenden Licht auch diesen Teil des Spektrums zu eliminieren. Die Lösungen erscheinen uns dann dunkelrot (wird im Praktikum demonstriert).

Die Spektren der beiden Chlorophylle a und b zeigen trotz prinzipieller Übereinstimmung charakteristische Verschiedenheiten, die auf einen geringfügigen Unterschied in der chemischen Struktur zurückgehen: Chlorophyll b besitzt im Pyrrolring B am C-Atom 7 anstelle der Methylgruppe bei Chlorophyll a eine Formyl- oder Aldehyd-Gruppe (-CHO). Beim Chlorophyll b sind dadurch die beiden Absorptionsmaxima im blauen und roten Spektralbereich einander deutlich genähert, d.h. der blaue Gipfel ist zu längeren (bathochrom), der hellrote zu kürzeren Wellenlängen (hypsochrom) verschoben. Hinzu kommt, dass beim Chlorophyll b der

blaue Gipfel höher (hyperchrom), der hellrote niedriger (hypochrom) als bei Chlorophyll a ist. Chlorophyll b, das im **gesamten** Blaubereich absorbiert, ist gelbgrün, Chlorophyll a, das längerwelliges Blau transmittiert, ist deshalb blaugrün gefärbt.
Die gelb bis orange gefärbten Carotinoide zeigen ein dreigipfliges Absorptionsspektrum im blauen Spektralbereich. Die Maxima der beiden Hauptgipfel liegen für die einzelnen Komponenten zwischen 430 und 490 nm.
Die Absorptionsspektren von Chlorophyllen und Carotinoiden können, wie dies in der Regel auch für andere Stoffe gilt, zur Identifizierung der Substanzen herangezogen werden. Eine exakte Identifizierung ist beispielsweise unerlässlich, wenn es um die mögliche photosynthetische Wirksamkeit eines der Pigmente geht. Voraussetzung für die Aufnahme eines hierfür brauchbaren Spektrums ist, dass die Substanz rein und in klarer Lösung vorliegt. Mit Einschränkungen bietet sich diese Möglichkeit, wenn die Pigmente durch die im vorangehenden Versuch beschriebene Dünnschichtchromatographie getrennt werden. Die nach der Trennung vorliegenden Farbzonen werden hierzu einzeln aus der Sorptionsschicht ausgeschabt, das jeweilige Pigment mit einem geeigneten Lösungsmittel aus dem Schichtmaterial eluiert und vom Eluat ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Zur Identifizierung der Pigmente werden die gewonnenen Absorptionsmaxima mit denjenigen der authentischen Verbindungen verglichen (vgl. S.24). Als zusätzliche Identifizierungshilfe wird noch das Verhältnis der Extinktionen der beiden Hauptmaxima ermittelt und dem entsprechenden Literaturwert gegenübergestellt. Eine so vorgenommene Identifizierung dient gleichzeitig der Untermauerung der im dünnschichtchromatographischen Versuch gemachten Identitätsaussage für ein Pigment.

b) Praktische Durchführung:

1. Ausschaben der Chlorophyll a-, Chlorophyll b- und Luteinzonen (Fortsetzung von Versuch I/1):
Pigmentzonen unmittelbar nach Betrachten der DC-Platte im UV-Licht ausschaben (Gefahr photooxidativer Zerstörung, wenn man zu lange wartet!). Hierzu Platte vertikal auf glattes Papier stellen, jeweilige Pigmentzone mit Schabespachtel sorgfältig ausschaben und ausgeschabte Schicht vom Papier durch Pulvertrichter in Zentrifugenglas (ungraduiert) schütten; Pulver der Chlorophyll a- und Chlorophyll b-Zonen mit jeweils ca. 1 ml Aceton (Pasteurpipette!), Pulver der Luteinzone mit ca. 1 ml

Ethanol (EtOH; Pasteurpipette!) übergießen und bis zur Weiterverarbeitung mit Stopfen verschlossen in Kühlschrank stellen.

2. Elution der Pigmente aus der DC-Schicht:

Zentrifugenglas mit Stopfen auf Whirl-Mix kurz durchschütteln. Suspension auf Glasfilternutsche (G4) geben und Pigmentlösung in graduiertes Zentrifugenglas saugen (Zentrifugenglas steht in einem Saugfinger, der an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist); auf Filternutsche und evtl. im Zentrifugenglas zurückbleibendes Sorptionsmaterial mehrfach mit wenig Aceton (Chlorophyll a und b) bzw. EtOH (Lutein) bis zur Farblosigkeit nachwaschen; Endvolumen des Eluats etwa **3 ml** (genaues Volumen im Protokoll notieren !); Lösungen bis zur Aufnahme der Spektren mit Stopfen verschlossen in Kühlschrank stellen.

3. Aufnahme der Absorptionsspektren:

Das Messgerät ist ein automatisch registrierendes Zweistrahl-Spektralphotometer der Firma Shimadzu, Modell UV 260, mit Bildschirm und Schreiber.

Messung der Chlorophyll a-Lösung:

a) Allgemeiner Messvorgang: das Absorptionsspektrum wird gegen Aceton als Blindlösung im Wellenlängenbereich zwischen 700 und 390 nm aufgenommen; durch Eingabe der Peak-Pick-Funktion (s.u.) werden neben der automatischen Aufzeichnung des Spektrums auch die Wellenlängen aller Haupt- und Nebenmaxima sowie deren Extinktionswerte automatisch ausgedruckt.

b) Parameter (P) am Gerät wie folgt einstellen: Messmodus (P Null): ABS (= Extinktion); Scangeschwindigkeit (P 1): FAST; Wellenlängenvorschub (P 2): 20 nm/cm; Extinktionsbereich (P 5): 0 – 1,0 (später bei Aufnahme des Spektrums Extinktionsbereich dem höchsten Absorptionsmaximum anpassen); Wellenlängenbereich (P 6): 700-390 nm; Spaltbreite (P 10): 1 nm (evtl. Datum (P 11) einstellen).

c) Funktionen (F) am Gerät wie folgt einstellen: Kommentar (F 1): „Chlorophyll a in Aceton“ als Überschrift für aufzunehmendes Spektrum; Peak-Pick-Funktion (F 4): PEAK (Lage der Maxima und jeweiliger Extinktionswert werden erfasst).

d) Nullabgleich: Zwei Küvetten mit je etwa 3 ml Aceton füllen: Küvetten mit Deckel verschließen. Die Küvetten müssen peinlich sauber sein, sie dürfen insbesondere keine Kratzer, außen anhaftende Flüssigkeitsreste oder Fingerspuren aufweisen. Eine Küvette in Referenzstrahl (Referenzküvette), die andere in Probenstrahl (Probenküvette) stellen. Bei geschlossenem Küvettenraum Extinktion auf Null einstellen (Taste: ABS 0) (der Monochromator muss dabei innerhalb des oben angegebenen Wellenlängenbereichs stehen).

e) Extinktionskontrolle: Probenküvette entleeren, mit Chlorophyll- Lösung füllen und in Probenstrahl zurückbringen; Monochromator auf 430 nm (höchstes Extinktionsmaximum von Chlorophyll a) einstellen und bei geschlossenem Küvettenraum Extinktion prüfen. Diese sollte nicht über 1.0 liegen, da sonst das Lambert-Beer'sche Gesetz, d.h. die Linearität der Beziehung Extinktion/Konzentration nicht erfüllt sein kann. Falls bei vorliegender Probenlösung die Extinktion größer als 1,0 ist, ihren Wert genau ermitteln und Chlorophyll-Lösung nach Zurückgießen in graduiertes Zentrifugenglas mit Aceton entsprechend verdünnen; Lösung danach wieder in Probenküvette überführen, Extinktion erneut messen und Extinktionsbereich (P 5) dem neuen Messwert anpassen.

f) Automatische Aufzeichnung der spektralanalytischen Daten: zur Aufnahme aller Daten am Schreiber bzw. Bildschirm werden nacheinander folgende Tasten gedrückt: FORMAT-Taste: Ausdrucken der Messbedingungen; ENTER-Taste; FRAME-Taste: Aufzeichnen des Rahmens mit Skaleneinteilung für Wellenlänge und Extinktion; START-Taste: Aufzeichnen der „Absorptionskurve“ und Ausdrucken der Wellenlängen und Extinktionswerte der „Absorptionspeaks“.

Messung der Chlorophyll b-Lösung:
Wie mit Chlorophyll a; Nullabgleich entfällt, da gleiches Lösungsmittel wie bei der Chlorophyll a-Messung; Wellenlängenbereich (P 6): 700-400 nm; Extinktionskontrolle bei 456 nm; Kommentar (F 1): „Chlorophyll b in Aceton“.

Messung der Lutein-Lösung:
Wie bei der Chlorophyll-Messung; Blindlösung: EtOH; Nullabgleich mit EtOH; Wellenlängenbereich (P 6): 550 - 390 nm; Extinktionskontrolle bei 446 nm; Kommentar (F 1): „Lutein in Ethanol“.

4. Auswertung:

Zur Identifizierung der Pigmente sind die Haupt- und Nebenmaxima, die sog. λ_{max}-Werte, den Aufzeichnungen zu entnehmen. Der sog. E_{430}/E_{663}-Wert, also das Verhältnis der Extinktionen der beiden Hauptmaxima von Chlorophyll a, wird errechnet und alle Daten tabellarisch mit Literaturangaben verglichen. Nach MACKINNEY (1940) besitzt Chlorophyll a in Aceton gelöst folgende λ-max-Werte: 410, 430, 535, 580, 615, 663 nm; der E_{430}/E_{663}-Wert beträgt 1,26 (Quotient der beiden Extinktionskoeffizienten bei 430 und 663 nm). Die λ-max-Werte für Chlorophyll b gelöst in Aceton liegen nach MACKINNEY (1940) bei: 455, 595, 645 nm; der E_{455}/E_{645}-Wert beträgt 2.8. Für Lutein in EtOH gelöst werden von HAGER und MEYER-BERTENRATH (1967) folgende λ-max-Werte angegeben: 422 (Schulter), 446, 475 nm; der $E_{445}/_{473}$-Wert beträgt nach Schopfer, Brennicke (1999) 1.07. Zu beachten: das zur Absorptionsmessung verwendete Lösungsmittel ist stets mitanzugeben, da von seiner Natur (Brechungsindex, Polarität) sowohl die Lage als auch die Höhe eines Absorptionsmaximums abhängig ist.

Literatur:

Mackinney (1940), aus: Paech, K. & Tracey, M.V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd.4, Springer, Berlin, 1955.

Hager, A. & Meyer-Bertenrath, T.: Die Identifizierung der an Dünnschichten getrennten Carotinoide grüner Blätter und Algen. Planta (Berl.) **76**, 149-168 (1967).

Schopfer, P. & Brennicke, A.: Pflanzenphysiologie.- 5. Aufl., Springer, 1999.

Versuch I/3:

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER CHLOROPHYLLE A UND B UND DER GESAMTCAROTINOIDE IN GRÜNEN BLÄTTERN

a) Theoretische Grundlagen:

Der Gehalt der Chloroplastenpigmente in den Blättern einzelner Pflanzen variiert in Abhängigkeit von äußeren und inneren Faktoren. Im Verlauf der Blattentwicklung einer Pflanze steigt er zunächst an, erreicht allmählich ein Maximum und nimmt bei Eintritt von Seneszenzerscheinungen wieder ab.
Von den Umweltfaktoren üben vor allem das Licht und die Nährstoffversorgung einen maßgeblichen Einfluss auf den Chlorophyllgehalt aus. Bezogen auf das Trockengewicht sind Schattenblätter chlorophyllreicher (und carotinoidärmer) als Lichtblätter der gleichen Pflanze. Allgemein gilt, dass der Chlorophyllgehalt mit steigender Beleuchtungsstärke abnimmt. Gut mit Stickstoff ernährte Pflanzen enthalten in der Regel mehr Chlorophyll als mangelhaft versorgte Pflanzen. Bekannt ist auch, dass saure und photooxidativ wirkende Immissionen der Luft den Pigmentgehalt der Pflanzen verändern.
Änderungen im Pigmentgehalt betreffen meist auch das Verhältnis der Pigmente zueinander. Auf Unterschiede in der Beleuchtungsstärke reagieren viele Pflanzen mit deutlichen Verschiebungen im Mengenverhältnis der beiden Chlorophylle. Beim photooxidativen Ausbleichen von Nadeln und Blättern erfolgt der Abbau von Chlorophyll a und ß-Carotin rascher als derjenige des Chlorophyll b und der Xanthophylle.
Jede Änderung im Gehalt an photosynthetisch aktiven Pigmenten wird stets auch eine Änderung in der Photosyntheserate und damit in der Energiebilanz der Pflanze nach sich ziehen. Der quantitativen Pigmentbestimmung, insbesondere der Chlorophyll-Analyse, kommt somit besondere Bedeutung zu. Eine quantitative Bestimmung von Chlorophyll ist auch dann notwendig, wenn der Chlorophyllgehalt als Bezugsgröße für Versuchsdaten verwendet werden soll. Dies ist bei Photosynthesemessungen häufig der Fall. In neuerer Zeit sind Chlorophyll- und Carotinoidmessungen auch als biochemische Indikationsmöglichkeit für die Einwirkung von Luftverunreinigungen benutzt worden.
Die quantitative Bestimmung der Pigmente erfolgt spektralphotometrisch. Zuvor müssen sie allerdings aus dem Untersuchungsmaterial extrahiert, eventuell sogar

chromatographiert werden. Als Messgröße im Spektralphotometer dient die Extinktion E. Sie gibt die Schwächung der Lichtintensität durch Absorption im Spektralphotometer an und ist der dekadische Logarithmus des Verhältnisses der Intensität des eingestrahlten Lichtes (I_0) zur Intensität des die Messprobe wieder verlassenden Lichtstrahls (I):

$$E = \log \frac{I_0}{I}$$

Das Photometer zeigt den Wert $E = \log (I_o/I)$ dimensionslos an, die Extinktion ist also eine dimensionale Größe. Sie ergibt sich aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E = \varepsilon \times c \times d$$

Dieses besagt, dass die Extinktion linear von der Konzentration c [mol x l^{-1}] und der Schichtdicke d [cm] der zu messenden Substanzlösung abhängt. Den Proportionalitätsfaktor ε bezeichnet man als molaren Extinktionskoeffizienten. Er stellt eine charakteristische Stoffkonstante (Einheit: 1000 cm^2 x mol^{-1} = cm^2 x $mmol^{-1}$; wird häufig ohne Dimension angegeben) dar, die wellenlängenabhängig ist (ε_λ) und meist für die Absorptionsmaxima (λ_{max}) einer Substanz angegeben wird. Anstelle des **molaren** Extinktionskoeffizienten ε verwendet man manchmal auch den **spezifischen** Extinktionskoeffizienten α mit der Einheit l x $\mathbf{g}^{-1}$ x cm^{-1}. Da Lage und Höhe der Absorptionsmaxima vom jeweiligen Lösungsmittel abhängen, muss bei der Angabe eines Extinktionskoeffizienten auch das Lösungsmittel genannt werden.

Zur quantitativen Bestimmung einer Substanz mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes wird zunächst die Extinktion E_x der jeweiligen Probelösung bei einer charakteristischen Wellenlänge (normalerweise ein Absorptionsmaximum) gemessen und anschließend aus E_x die Konzentration c_x der zu bestimmenden Substanz nach einer der folgenden Methoden ermittelt:

A. Berechnung nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (vgl. vorliegenden Versuch)
B. Bestimmung mit Hilfe einer Vergleichslösung (vgl. Versuch III/2)
C. Bestimmung über eine Eichkurve

Zu Methode A:

Bei Kenntnis des Extinktionskoeffizienten ε (α) (er kann in vielen Fällen der Literatur entnommen werden) errechnet sich die Konzentration der zu bestimmenden Substanz aus der gemessenen Extinktion E_x wie folgt:

$$c_X = \frac{E_x}{\varepsilon(\alpha) \times d}$$

Zu Methode B:

Bei unbekanntem Extinktionskoeffizienten kann die Gehaltsbestimmung mit Hilfe einer Vergleichslösung von bekannter Konzentration c_v der zu bestimmenden Substanz durchgeführt werden. Bei gleicher Schichtdicke d gemessen, gilt für die Extinktion der Vergleichslösung:

$$E_v = \varepsilon(\alpha) \times c_v \times d$$

und für die Extinktion der Probelösung:

$$E_x = \varepsilon(\alpha) \times c_x \times d$$

Die Extinktionswerte beider Lösungen verhalten sich wie ihre Konzentrationen:

$$\frac{E_x}{E_v} = \frac{c_x}{c_v}$$

Durch Umformen ergibt sich die unbekannte Konzentration c_x:

$$c_x = c_v \times \frac{E_x}{E_v}$$

Zu Methode C:

Zum Erstellen einer Eichkurve dienen mehrere Lösungen mit bekannter, aber unterschiedlicher Konzentration der zu bestimmenden Substanz (Eichlösungen). Die gemessenen Extinktionen dieser Lösungen werden in einem Diagramm als Funktion der jeweiligen Konzentration aufgetragen. Aus der so erhaltenen Eichkurve kann mit der gemessenen Extinktion der unbekannten Probe deren Konzentration graphisch ermittelt werden.

Mehrkomponentenanalyse:

Nach Methode A können Substanzen, die gemeinsam in einer Lösung vorliegen und deren Absorptionskurven sich teilweise überdecken, dennoch einzeln bestimmt werden. Beispielsweise werden die beiden Chlorophylle im Gemisch eines Blattextraktes häufig quantitativ nebeneinander erfasst. Dies geschieht durch die photometrische Mehrkomponentenanalyse, bei der die Konzentrationen der Einzelkomponenten rechnerisch ermittelt werden. Hierbei wird vorausgesetzt, dass sich die Extinktionen der Einzelkomponenten bei jeder Wellenlänge addieren. Es gilt also:

$$E_{total} = E_1 + E_2 + ... + E_n$$

oder (d = konst.)

$$E_{total} = \varepsilon_1 (\alpha_1) \times c_1 + \varepsilon_2 (\alpha_2) \times c_2 + ... + \varepsilon_n (\alpha_n) \times c_n$$

Liegt ein Gemisch aus zwei Komponenten vor, muss die Extinktion bei zwei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Für beide Wellenlängen müssen die Extinktionskoeffizienten für beide Komponenten bekannt sein.

Im Falle der Chlorophylle wird in Aceton bei 662 nm (λ_{max} für Chlorophyll a im langwelligen Bereich) und 645 nm (λ_{max} für Chlorophyll b im langwelligen Bereich) gemessen. Die zugehörigen spezifischen Extinktionskoeffizienten (α) sind der folgenden Tabelle (nach Lichtenthaler & Wellburn, 1983) zu entnehmen:

λ_{max} [nm]	$\alpha_{Chl\ a}$	$\alpha_{Chl\ b}$ [$l \times g^{-1} \times cm^{-1}$]	$\alpha_{Gesamtcarotinoide}$
662	88,88	11,22	-
645	18,91	56,11	-
470	2,27	81,36	227

Für die Gesamtextinktion bei 662 und 645 nm (d=1) gilt dann:

(1) $$E_{662} = 88{,}88 \times c_{Chl\ a} + 11{,}22 \times c_{Chl\ b}$$

(2) $$E_{645} = 18{,}91 \times c_{Chl\ a} + 56{,}11 \times c_{Chl\ b}$$

Damit liegen zwei Gleichungen vor mit den unbekannten Konzentrationen $c_{Chl\ a}$ und $c_{Chl\ b}$. Diese lassen sich durch Einsetzen errechnen:

(a) $c_{Chl\,a} = 11{,}75 \times E_{662} - 2{,}35 \times E_{645}$ [$\mu g \times ml^{-1}$]

(b) $c_{Chl\,b} = 18{,}61 \times E_{645} - 3{,}96 \times E_{662}$ [$\mu g \times ml^{-1}$]

Zur Bestimmung von drei Komponenten müssen Extinktionswerte bei drei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Dies ist der Fall, wenn im Rohextrakt eines Blattes neben den beiden Chlorophyllen auch die Gesamtcarotinoide (Carotine und Xanthophylle) erfasst werden sollen. Es wird dann zusätzlich im Blaubereich bei 470 nm, dem Maximum im längerwelligen Bereich der Absorptionskurve aller Carotinoide, gemessen. Die dritte Bestimmungsgleichung lautet:

(3) $E_{470} = 227 \times c_{Car.} + 2{,}27 \times c_{Chl\,a} + 81{,}36 \times c_{Chl\,b}$

wobei die Konzentration der Gesamtcarotinoide mit $c_{Car.}$ angegeben ist. Für die Konzentration der Gesamtcarotinoide (Ccar.) ergibt sich folgende Gleichung (c):

(c) $$c_{Car.} = \frac{1000 \times E_{470} - 2{,}27 \times c_{Chl\,a} - 81{,}4 \times c_{Chl\,b}}{227} \quad [\mu g \times ml^{-1}]$$

Die Berechnung der drei unbekannten Konzentrationen mit Hilfe der genannten Gleichungen ist insofern vereinfacht, als die Carotinoide im Rotbereich, also bei den Wellenlängen 662 und 645 nm, keine Absorption besitzen.
Anzumerken ist noch, dass die Einzelsubstanzen der Carotinoide (vgl. Versuch I/1) nur nach vorheriger chromatographischer Trennung quantitativ bestimmt werden können.

Im vorliegenden Versuch wird der Gehalt der beiden Chlorophylle und der Gesamtcarotinoide in Brennnesselblättern (**warum?**) bestimmt. Da es sich um eine quantitative Analyse handelt, haben selbstverständlich alle Einzelschritte des Versuchs in quantitativem Maßstab zu erfolgen, d.h., das zu analysierende Blattmaterial ist exakt einzuwiegen, die im Blattmaterial enthaltenen Pigmente sind daraus erschöpfend zu extrahieren, es dürfen bei der Extraktion und bei der Bearbeitung des Extraktes keine Pigmentverluste eintreten, und schließlich müssen die aus der eingewogenen Blattmenge extrahierten Pigmente zur photometrischen Messung in einem genau definierten Lösungsvolumen vorliegen.

b) Praktische Durchführung:

1. Extraktion:

Etwa **250 mg** frische Brennnesselblätter (*Urtica dioica*) ohne Stiele werden mit einer Schere zerkleinert und auf der Analysenwaage abgewogen. Mit wenig Aceton werden sie im Mörser unter Zusatz einer Spatelspitze $CaCO_3$ und einiger Spatelspitzen Seesand gründlich zerrieben (es dürfen danach keine Blattstrukturen mehr erkennbar sein!), der Überstand nach Zugabe weiterer ml Aceton vorsichtig (dünnen Glasstab an Mörserausguss anlegen!) in eine Glasfilternutsche (G4) abdekantiert und mittels Wasserstrahlpumpe in einen 50 ml Rundkolben abgesaugt. Der Rückstand im Mörser wird mehrmals mit Aceton ausgespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls abgesaugt. Der Spülvorgang wird solange wiederholt, bis die Spülflüssigkeit ± farblos ist. Danach wird der Extrakt aus dem Rundkolben durch einen Trichter in einen 50 ml-Messkolben gegossen. Auch der Rundkolben wird anschließend mehrfach nachgespült, bis die **50 ml**-Marke im Messkolben erreicht wird. Der Messkolben wird mit Parafilm verschlossen.

2. Extinktionsmessung:

Die Extinktion des Extrakts wird bei **662** (Chl a), **645** (Chl b), und **470** (Gesamtcarotinoide) nm gemessen. Das Extraktionsmittel (Aceton) dient als Vergleichslösung, mit der vor Beginn der Messungen ein Nullabgleich vorzunehmen ist; vgl. hierzu in Versuch I/2 die notwendigen Einstellungen am Spektralphotometer.

c) Auswertung:

Die Konzentrationen der Pigmente werden nach den in den „Theoretischen Grundlagen“ angegebenen Gleichungen (a), (b) und (c) berechnet.

Für den jeweiligen Pigmentgehalt pro g Frischgewicht des Blattmaterials gilt:

Pigmentgehalt [mg x g^{-1}] =

$$\frac{\text{Extraktionsmittel [ml] x Pigmentkonzentration Extrakt [µg x ml}^{-1}\text{]}}{\text{Blatteinwaage [mg]}}$$

Aus den Ergebnissen sollen darüber hinaus der Gesamtchlorophyllgehalt und die Verhältnisse zwischen den beiden Chlorophyllen sowie zwischen Chlorophyllen (Gesamtchlorophyll) und Carotinoiden bestimmt werden. Die erhaltenen Werte sind übersichtlich in einer Tabelle darzustellen und zusammen mit den in den beiden ausgeteilten Literaturstellen angegebenen Werten zu diskutieren.

Literatur:

Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R.: Determination of the total carotinoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents.- Biochem. Soc. Transactions **603**, 591-592 (1983).

Versuch II

PHYTOHORMONE

Zur Thematik des Versuchs siehe:
Campbell, S. 949-951; 961-994; Lüttge et al. S. 522-530; Mengel, S. 250-257; Nultsch, S. 460-470; Taiz & Zaiger S. 423-492, 539-558.

Versuch II/1:
ZYLINDERTEST AUF AUXIN

a) Theoretische Grundlagen:

Hormone kommen in der Pflanze definitionsgemäß nur in sehr kleinen Mengen vor; so enthält z. B. eine Haferkoleoptile nur etwa 10^{-10} Mol des Hormons Auxin (= Indol-3-essigsäure, abgekürzt IES oder engl. IAA; Strukturformel: Campbell, S. 968). Für den Nachweis dieses Phytohormons und vor allem für seine quantitative Bestimmung sind deshalb chemische Methoden meist zu wenig empfindlich oder nicht spezifisch genug. Zur quantitativen Bestimmung verwendet man daher biologische Tests, deren Prinzip darin besteht, dass man an lebenden, auf das Hormon ansprechenden Objekten eine spezifische Reaktion misst. Die Stärke der Reaktion wird dann mit einer sog. Eichkurve (Reaktion auf das entsprechende Hormon in bekannter Konzentration) verglichen. Ein solcher **Biotest** bietet auch noch eine weitere Untersuchungsmöglichkeit: man kann damit prüfen, ob synthetisch hergestellte Stoffe die gleiche Reaktion hervorrufen wie das pflanzeneigene Hormon und weiterhin, von welchen Faktoren die untersuchte Reaktion abhängt.

Als Testobjekt verwendet man verständlicherweise solche Pflanzenteile, die auf das zu untersuchende Hormon mit einer signifikanten Reaktion ansprechen. Beim Auxin ist das klassische Objekt die etiolierte, d. h. im Dunkeln angezogene Koleoptile (Keimscheide; koleo-, koleós, gr. Scheide; koleo-ptile: ptílon, gr. Flügel, Feder; Scheide am Sprossvegetationspunkt bei Poaceen) von Gräsern, vor allem *Avena* (Hafer), im Versuch aber *Triticum* (Weizen; siehe dazu auch Campbell, S. 965-967). Bei Koleoptilen wird das Auxin in der nicht wachstumsfähigen Spitze produziert, wandert polar basipetal und löst in den tiefer gelegenen Regionen ein starkes Streckungswachstum aus. Entfernt man

die Spitze, reagiert das übrige Koleoptilgewebe aus Mangel an eigenem Auxin auf von außen zugeführtes Auxin sehr empfindlich.

Die Größe des Streckungswachstums kann man mit zwei Methoden messen:

1.) Man führt dem Koleoptilstumpf Auxin einseitig zu und löst damit an dieser Flanke Zellstreckung aus, was zu einer Krümmung in Richtung der entgegengesetzten Flanke führt.

Die Größe des Krümmungswinkels dient als Maß für die Auxinmenge, „WENT'scher Krümmungstest“ (siehe Campbell S. 967). Dieser Test ist zwar die genaueste Methode, aber relativ schwierig auszuführen.

2.) Einfacher, aber etwas weniger empfindlich, ist der „Zylindertest“, bei dem die Längenzunahme eines Koleoptilzylinders in der entsprechenden Hormonlösung gemessen wird. Die höchste Zuwachsrate im Koleoptilzylinder-Test liegt im Bereich einer IES-Konzentration von 10^{-5} mol/l. Höhere oder niedrigere Konzentrationen sind weniger oder gar nicht wirksam.

b) Praktische Durchführung:

Lösungen:

Als Testlösungen werden benutzt:

Lösung **1**: 1 x 10^{-5} mol/l IES (Vorratslösung 10^{-4} mol/l) in wässrigem 0,01 mol/l Phosphatpuffer (KH_2PO_4; pH 5,0; der Phosphatpuffer wurde vorher mit Na_2HPO_4 x 2 H_2O am pH-Meter auf pH 5 eingestellt; **warum**?).

Lösung **2**: reine Phosphatpufferlösung (pH 5,0) als Kontrolle (IES-Konz. = 0).

Beide Lösungen wegen Lichtempfindlichkeit der IES möglichst wenig dem Licht aussetzen, also **sofort** unter den Dunkelsturz stellen.

Versuch:

Gerade gewachsene, etiolierte (4 Tage im Dunkeln mit 4x5 Rotlichtphasen angezogene) **30-40 mm** lange Weizen-Koleoptilen (*Triticum aestivum*) werden mit einer Korkpinzette direkt über der Basis vorsichtig abgezupft. Anschließend werden pro Versuchslösung 14 Koleoptilen mit einer Dekapitierungspinzette etwa **15-20 mm** unterhalb der Spitze von der Schmalseite (Weizenkoleoptilen haben einen ovalen Querschnitt) her eingeritzt, durch vorsichtiges Biegen gebrochen, der apikale Teil ohne

Quetschen von dem eingeschlossenen Primärblatt abgezogen und mit einer Uhrfederpinzette vorübergehend in einer Schale mit Pufferlösung unter Dunkelsturz aufbewahrt (um Trockenstress zu vermeiden). Danach werden sie der Pufferlösung entnommen, kurz auf einem Zellstofftuch abgetrocknet und dann mit der Spitze gegen den Anschlag des Schneideapparates (**Dekapitierungslänge 3 mm**) gelegt, um die Spitzen zu dekapitieren. **2 x 14** Koleoptilen werden auf **5 mm** Länge geschnitten und die erhaltenen Zylinder in die beiden jeweils mit **10 ml** IES- bzw. Pufferlösung versehenen Glasschalen gegeben (Uhrzeit notieren, Protokoll!). Wichtig ist, dass die Koleoptilen nicht zu lange dem Licht ausgesetzt sind (**warum?**). Deshalb werden die beiden Glasschalen mit den Koleoptilen bei Raumtemperatur unter einen Dunkelsturz gestellt. Die Versuchsdauer beträgt ca. **4h**.
Danach werden die Zuwachslängen der Zylinder **mikroskopisch** vermessen. Hierzu werden sie mit der Uhrfederpinzette aus der Lösung entnommen, wieder kurz auf einem Zellstofftuch getrocknet und dann auf einen speziell dazu hergerichteten Objektträger jeweils mit einer Schnittfläche gegen einen Anschlag gelegt. Die über die 5 mm-Markierung des Objektträgers hinausreichenden Endstücke der Zylinder werden mit Hilfe eines geeichten Messokulars bei 32x Vergrößerung [z.B. 10 (Okular) x 3,2 (Objektiv)] gemessen. Die gezählten Skalenteile werden notiert und mit dem Faktor 0.03 multipliziert. Daraus ergibt sich ein auf maximal 0.03 mm (ein Teilstrich im Messokular entspricht 30µ) genauer Zylinderzuwachs.
Die Messtabelle hierzu entwerfen Sie bitte vor dem Versuchstag.

c) Auswertung:

Um eine statistisch gesicherte Aussage über die wachstumsstimulierende Wirkung von IES machen zu können, sind die Ergebnisse der Zuwachsmessung mit IES dem sogenannten **t-Test** zu unterziehen. **Verglichen werden soll hierbei das Ergebnis der Kontrolllösung mit dem Ergebnis der IES-Lösung.**

Die Streuungsbreite der Messwerte um $\bar{x}$ wird durch die „Standardabweichung“ s gekennzeichnet. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum a^2}{n-1}}$$

wobei a die Abweichung des jeweiligen Messwertes vom Mittelwert und n die Zahl der Einzelwerte ist.

Will man unterscheiden, ob der Mittelwert des Zuwachses bei der Kontrolle von dem bei 10^{-5}-molarer Auxinlösung wirklich verschieden ist, dann muss die Wahrscheinlichkeit für den Unterschied mit Hilfe einer statistischen Methode berechnet werden. Eine Prüfung dieser Wahrscheinlichkeit oder des Grades der Signifikanz ist mit Hilfe der Prüffunktion t möglich, die nach folgender Formel berechnet wird (t-Test oder Student-Test):

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_D}$$

wobei s_D der mittlere Fehler der Differenz der beiden Mittelwerte ist und sich nach der Formel:

$$s_D = \sqrt{\frac{\sum a_1^2 + \sum a_2^2}{n_1 + n_2 - 2}(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})}$$

berechnet. Die verwendeten Symbole wurden bereits definiert, die Indizes $_1$ bzw. $_2$ beziehen sich auf die beiden betrachteten Messreihen.

Die statistische Sicherheit für den Unterschied der beiden Mittelwerte ist umso größer, je größer der Wert t ist. Aus der beigefügten **Tafel zur t-Verteilung** kann entnommen werden, welchen Wert t bei einer entsprechenden Zahl von Freiheitsgraden f (= $n_1 + n_2 - 2$) und bei bestimmten Sicherungsgrenzen mindestens haben muss. Liegt der errechnete t-Wert numerisch über dem theoretischen, dann ist der Unterschied mit der entsprechenden Sicherheit wahrscheinlich. Der Grad der Wahrscheinlichkeit wird durch den p-Wert ausgedrückt; er ist gleich α, wird aber meist nicht in % angegeben (z. B. α = 0.25 %, p = 0.0025).

Tafel:

t-Verteilung

f \ α	25	12.5	5	2.5	1	0.5	0.1	0.05
1	1.00	2.41	6.31	12.7	31.82	63.7	318.3	637.0
2	.816	1.60	2.92	4.30	6.97	9.92	22.33	31.6
3	.765	1.42	2.35	3.18	4.54	5.84	10.22	12.9
4	.741	1.34	2.13	2.78	3.75	4.60	7.17	8.61
5	.727	1.30	2.01	2.57	3.37	4.03	5.89	6.86
6	.718	1.27	1.94	2.45	3.14	3.71	5.21	5.96
7	.711	1.25	1.89	2.36	3.00	3.50	4.79	5.40
8	.706	1.24	1.86	2.31	2.90	3.36	4.50	5.04
9	.703	1.23	1.83	2.26	2.82	3.25	4.30	4.78
10	.700	1.22	1.81	2.23	2.76	3.17	4.14	4.59
11	.697	1.21	1.80	2.20	2.72	3.11	4.03	4.44
12	.695	1.21	1.78	2.18	2.68	3.05	3.93	4.32
13	.694	1.20	1.77	2.16	2.65	3.01	3.85	4.22
14	.692	1.20	1.76	2.14	2.62	2.98	3.79	4.14
15	.691	1.20	1.75	2.13	2.60	2.95	3.73	4.07
16	.690	1.19	1.75	2.12	2.58	2.92	3.69	4.01
17	.689	1.19	1.74	2.11	2.57	2.90	3.65	3.96
18	.688	1.19	1.73	2.10	2.55	2.88	3.61	3.92
19	.688	1.19	1.73	2.09	2.54	2.86	3.58	3.88
20	.687	1.18	1.73	2.09	2.53	2.85	3.55	3.85
21	.686	1.18	1.72	2.08	2.52	2.83	3.53	3.82
22	.686	1.18	1.72	2.07	2.51	2.82	3.51	3.79
23	.685	1.18	1.71	2.07	2.50	2.81	3.49	3.77
24	.685	1.18	1.71	2.06	2.49	2.80	3.47	3.74
25	.684	1.18	1.71	2.06	2.49	2.79	3.45	3.72
26	.684	1.18	1.71	2.06	2.48	2.78	3.44	3.71
27	.684	1.18	1.71	2.05	2.47	2.77	3.42	3.69
28	.683	1.17	1.70	2.05	2.47	2.76	3.41	3.67
29	.683	1.17	1.70	2.05	2.46	2.76	3.40	3.66
30	.683	1.17	1.70	2.04	2.46	2.75	3.39	3.65
40	.681	1.17	1.68	2.2	2.42	2.70	3.31	3.55
60	.679	1.16	1.67	2.00	2.39	2.66	3.23	3.46
120	.677	1.16	1.66	1.98	2.36	2.62	3.17	3.37
∞	.674	1.15	1.64	1.96	2.33	2.58	3.09	3.29

Irrtumswahrscheinlichkeit für einseitige Fragestellung (in %)

Versuch II/2:

NACHWEIS DER AMYLASE-AKTIVITÄT UND INDUKTION DER α-AMYLASE IN GERSTENKARYOPSEN DURCH GIBBERELLINSÄURE

a) Theoretische Grundlagen:

Gibberelline zählen zu den wachstumsfördernden Pflanzenhormonen. Sie wurden benannt nach dem Pilz *Gibberella fujikuroi* (eine imperfekte Form von *Fusarium moniliforme*) , der z.B. frühzeitige starke Internodienverlängerung in Reispflanzen verursacht, was zu einer Schwächung der Pflanzen führt. Heute weiß man, dass Gibberelline zunächst bei der Keimung wichtig sind und dort in den Samen gespeicherte Nährstoffe mobilisieren. Gibberelline verursachen auch das Streckungswachstum beim Übergang der vegetativen zur reproduktiven Phase, z.B. in Gräsern, Salat oder Kohlpflanzen („Schießen"). Zudem sind Gibberelline auch beim Fruchtwachstum und anderen morphologischen Prozessen beteiligt.

Bei der Keimung stellen die Reservestoffe für die Keimpflanze zunächst die einzige Quelle organischer Nährstoffe dar. Ihre Verwertung durch die Jungpflanze kann allerdings nicht direkt erfolgen, denn es handelt sich um unlösliche oder kolloidlösliche makromolekulare Substanzen, die zunächst „mobilisiert", also für die Jungpflanze verwertbar gemacht werden müssen. Sie werden in lösliche, niedermolekulare Einheiten zerlegt, die dann zu den stoffwechselaktiven Geweben und Organen der Keimpflanze geleitet werden können. Der „Mobilisierung" liegen enzymatische Prozesse zugrunde. Einige bei diesen Vorgängen aktive Enzyme liegen bereits im ruhenden Samen vor und werden bei der Quellung lediglich aktiviert, andere müssen während des Keimvorgangs neu gebildet werden (mRNA und Proteinsynthese); dies ist nur bei entsprechendem Quellungsgrad des Samens möglich.

Die Mobilisierung eines pflanzlichen Reservestoffes unter Beteiligung von Gibberellinen wird im Folgenden am Beispiel der „Stärkeverzuckerung" in Gerstenkaryopsen (**Karyopse**: Grasfrucht aus oberständigem Fruchtknoten, bei der Frucht- und Samenschale verwachsen sind = „Gerstenkorn") verfolgt.

Stärke ist das wichtigste Speicherkohlenhydrat in Pflanzen. Sie entsteht in den Chloroplasten bei der Photosynthese aus der zunächst gebildeten Glukose. Die Organellen, in denen Stärke gespeichert wird, sind Amyloplasten. Sie finden sich vorwiegend in Speichergeweben und Speicherorganen wie Samen, Wurzeln oder Spross- bzw. Wurzelknollen.

Pflanzliche Stärke besteht in der Regel aus zwei chemisch verschiedenen Polysacchariden: Amylose und Amylopektin. In Stärkekörnern liegt Amylopektin meist zu 80-90% vor, häufig als Hüllsubstanz des Stärkekorns, Amylose im Zentrum zu 10-20%.

Amylose besteht aus 200–1000 Glukose-Molekülen, die in ausschließlich 1→4-α-D-Glykosidbindungen in demnach unverzweigter Kette verknüpft sind. Das dieser Kette zugrunde liegende Disaccharid ist die Maltose, eine 1→4-α-D-Diglukose.

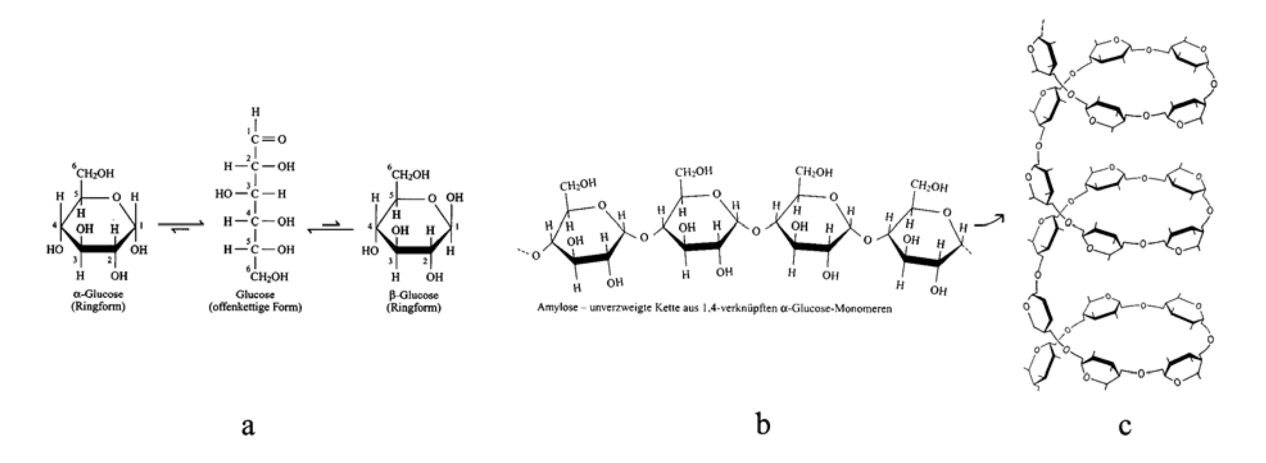


Abb. 5 a, b: Raven et al., Biologie der Pflanzen, 2000; **c**: Raumstruktur der Amylose, Karlson et al. Biochemie, 1994

Im Amylose-Polysaccharid stellt das Glukose-Molekül, dessen HO-Gruppe am anomeren C-1-Atom mit dem nächsten Glukose-Molekül glykosidisch verknüpft ist, das sog. „nicht-reduzierende" Ende dar. Das Glukose-Molekül am anderen Ende des Polymers, dessen C-4-OH-Gruppe mit der C-1-HO-Gruppe des vorhergehenden Glukose-Moleküls verknüpft ist, bildet das sog. „reduzierende" Ende, da es noch seine reaktionsfähige C-1-HO-Gruppe besitzt.

Wegen der sterischen Anordnung der 1→4-Glykosidbindungen kommt es im Amylose-Polymer zu einer spiraligen Aufwindung (Schraube oder Helix). Bei der zum Nachweis von Stärke verwendeten „Iodstärkereaktion" werden Iodmoleküle aus der KII_2 -Lösung (Lugol'sche Lösung) in den Hohlraum der Amyloseschraube eingelagert, wodurch eine Einschlussverbindung entsteht.

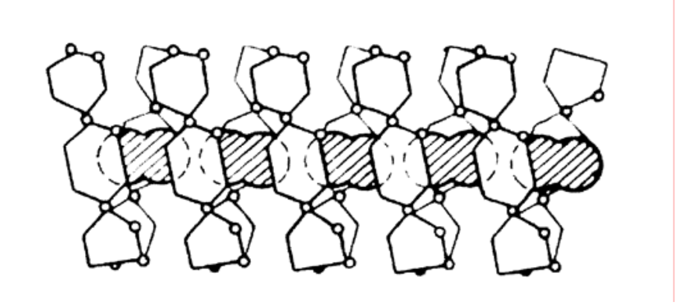


Abb. 6: Aufbau des Amylose-Iod-Komplexes: in die Zwischenräume der schraubig gewundenen Kette aus Glukose (Sechsecke!) sind Iodmoleküle (gestrichelt!) eingelagert; aus Kretowitsch, Grundzüge der Biochemie der Pflanzen, 1965

Daraus resultiert eine veränderte Lichtabsorption der Iodmoleküle, die je nach Kettenlänge eine tiefe Blaufärbung oder, bei kürzeren Ketten, nur eine Violett-, Rot- oder Rotbraunfärbung bewirkt.

Amylopektin besteht aus 2000 – 22000 Glukosemolekülen, bei denen es neben den 1→4-α-D-Glykosidbindungen immer wieder zu 1→6-α-D-Glykosidbindungen kommt; Etwa jedes 25igste Glukosemolekül zeigt eine 1→6-Bindung. Auf diese Weise kann Amylopektin als „verzweigte“ Stärke angesehen werden.

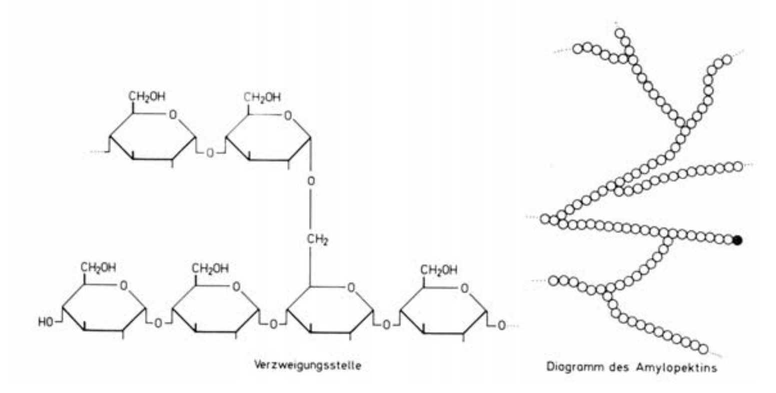


Abb. 7: Struktur des Amylopektins; am Diagramm „schwarz“, ein reduzierendes Kettenende; Heß, Pflanzenphysiologie, 1991

Die Schraubenstruktur im Amylopektin besteht insgesamt aus kürzeren Teileinheiten wie die der Amylose, woraus eine violette bis rote Färbung mit KII_2 entsteht.

Werden Stärkekörner mit heißem Wasser behandelt, so geht Amylose kolloidal in Lösung. Amylopektin ist in heißem Wasser unlöslich, oberhalb 60 °C quillt es auf: Stärkekleister!

Der enzymatische Abbau der Stärke erfolgt entweder durch Phosphorylasen oder durch Hydrolasen. Beim Abbau durch Phosphorylasen werden die Glykosidbindungen durch Phosphorsäure gespalten, also „phosphoryliert“; als Spaltprodukt entsteht Glukose-1-phosphat. Beim Abbau durch Hydrolasen werden die Glykosidbindungen durch Wasser

„hydrolytisch“ gespalten. Diese Enzyme heißen Amylasen. Sie hydrolysieren Stärke zum Disaccharid Maltose.

In Gerstenkörnern (*Hordeum vulgare*) wird die α-Amylase bei der Keimung in den Aleuronzellen synthetisiert und ins Endosperm sezerniert. Dies wird durch Gibberellinsäure (GA) gesteuert. Das vom Embryo produzierte Hormon gelangt nach der Quellung in die Aleuronzellen und bewirkt dort die Aktivierung des α-Amylase Gens. Es kommt so zu einer *de novo*-Synthese der α–Amylase. Die Resorption der Zucker erfolgt durch den Embryo.

Dieser Prozess wird auch in der Brauerei ausgenutzt. Um die Maltoseproduktion bei der Malzbildung zu beschleunigen, wird gelegentlich GA zugesetzt.

In diesem Versuch wird die α-Amylase-Aktivität in gequollenen und nicht gequollenen Gerstenkörnern überprüft, die auf einem Stärke-Agar Medium inkubiert werden. Durch KII_2-Lösung kann die intakte Stärke nachgewiesen werden. Um die Getreidekörner mit α -Amylase-Aktivität zeigen sich farblose Höfe aufgrund des Stärkeabbaus. Durch Zusatz von Gibberellinsäure im Stärkeagar wird die α-Amylase-Synthese verstärkt. Keine Aktivität ist nachweisbar, wenn die Getreidekörner durch Hitze abgetötet werden.

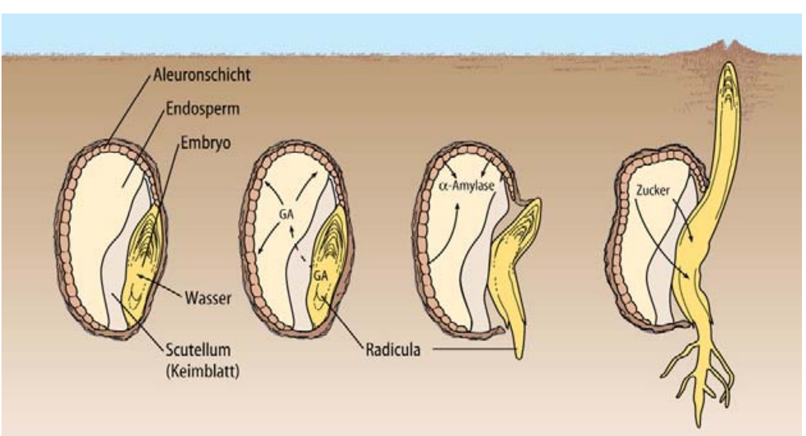


Abb.: Mobilisierung von Zucker während der Keimung von Gerstenpflanzen durch Gibberellinsäure (GA) (Campbell, Biologie, S. 950). GA wird vom Embryo produziert und induziert in der Aleuronschicht α-Amylase. Dieses Enzym baut im Endosperm Stärke ab.

b) Praktische Durchführung.

Zunächst wird der **Stärkeagar** hergestellt. Dazu werden pro Gruppe in einem 500 ml Becherglas 375 mg Kartoffelstärke, 6 g Agar und 300 mg $CaCl_2x2H_2O$ in 255 ml H_2O deion. auf dem Magnetrührer unter Rühren kurz aufgekocht (Achtung, brennt an!). Nachdem eine ± klare Lösung entstanden ist, wird sie bei 60°C im Trockenschrank am Arbeitsplatz aufbewahrt (**warum**?). Danach werden pro Gruppe aus einer 0.3 millimolaren (mM) Stammlösung Gibberellinsäure (GA_3; Strukturformel: Campbell S. 968) 20 ml einer 0.03 mM-Lösung hergestellt (in 20 ml Messkolben).
Zur Versuchsdurchführung werden insgesamt 7 Petrischalen gebraucht. Zur Herstellung von 3 Petrischalen mit je 30 ml Inhalt werden in jede einzelne 5 ml der 0.03 mM GA_3-Lösung mit 25 ml Stärkeagar gemischt (die GA_3 wird dadurch 0.005 mM; **verstanden**?). Zuerst gibt man mit einer 5 ml Vollpipette die GA_3-Lösung in die beschriftete Petrischale, gießt 25 ml warmen Stärkeagar aus einem 50 ml Messzylinder dazu und verrührt das Ganze mit einem Plastikspatel. Man stellt dann 3 weitere Petrischalen mit 30 ml reinem Stärkeagar her. Zur Kontrolle wird eine 7. Petrischale mit Stärkeagar hergestellt, die nicht mit Karyopsen bestückt wird.
Ein Teil der Karyopsen wurde zur Quellung ca. **24 h** vorher in eine Petrischale mit Leitungswasser gelegt: a) lebende und b) 72 h in 70% EtOH und anschließend 8 h bei 120° C erhitzte und dadurch abgetötete Karyopsen (Zahl siehe unten!).
Nach Abkühlen des Stärkeagars (ca. 10 min) werden die Petrischalen mit Hilfe einer beigelegten Schablone folgendermaßen beschickt:

I Petrischalen mit GA_3

Petrischale 1: lebende, gequollene Karyopsen, **quer** halb durchgeschnitten (**warum**?), mit Embryo (**warum**?)
Petrischale 2: lebende, trockene Karyopsen, **quer** halb durchgeschnitten, mit Embryo
Petrischale 3: abgetötete, gequollene Karyopsen, **quer** halb durchgeschnitten, mit Embryo

II Petrischalen ohne GA_3 wie oben

(**Vorsicht**: vor dem Schnitt eines jeden Korntyps, Rasierklingen, Brettchen und Pinzetten gründlich reinigen!)
Je 8 Gerstenkaryopsen werden mit der Schnittfläche nach unten (nach vorherigem Abtupfen auf Zellstofftuch) vorsichtig mit einer Pinzette auf den Agar gelegt und leicht angedrückt.

Man lässt die abgedeckten Petrischalen **24 h** bei Zimmertemperatur auf dem Labortisch stehen. Die α-Amylase diffundiert aus dem Gerstenkorn gleichmäßig in alle Richtungen in den Agar und baut die Stärke rund um die Auflagefläche der jeweiligen Kornhälfte ab. Man muss ferner davon ausgehen, dass die der einen Petrischale zugesetzte GA_3 ebenfalls und zusätzlich über die Schnittfläche in die Kornhälfte diffundieren kann (**Folgerung?**).

Nach **24 h** wird zunächst von jeder Petrischale mit den Karyopsenhälften ein Digitalfoto gemacht. Dann werden sie mit einer Pinzette entfernt und der Agar vorsichtig mit **KII_2-Lösung** (Lugolsche Lösung; 300 ml Wasser, 2 g KI, 0,2 g I_2) übergossen (inklusive Kontrollpetrischale). Man lässt die Lösung etwa 20 Sekunden einwirken und gießt dann das KII_2 ab. Mit einem **Digitalfoto** (eigene Kamera mitbringen) werden die entstandenen weißen Flecken dokumentiert. Anschließend werden die Petrischalen mit ihrem Deckel umgekehrt auf einen Lichtkasten gelegt, die Ø der Flecken mit Hilfe eines Lineals abgelesen und notiert. Der gesamte übrige Stärkeagar ist nun blau gefärbt.

Die Messtabelle hierzu entwerfen Sie bitte vorher!

c) Auswertung:

Der Durchmesser der erkennbaren weißen Flecken als Ausmaß der α-Amylaseaktivität ist graphisch darzustellen. Wie interpretieren Sie die Ergebnisse mit den unterschiedlich behandelten Gerstenkörnern? Kurze schriftliche Zusammenfassung!

Versuch II/3:

INDUKTION DER DORMANZ DURCH ABSCISINSÄURE

a) Theoretische Grundlagen:

Neben anderen Wirkungen kann Abscisinsäure (ABA; Strukturformel: Campbell S. 968) in der pflanzlichen Entwicklung Ruhezustände einleiten und aufrechterhalten. Sie verhindert während der frühen Reifungsphase des Embryos dessen spontane Auskeimung in der befruchteten Samenanlage (Viviparie) und erzwingt die Weiterentwicklung zum austrocknungstoleranten Samen unter Speicherstoffeinlagerungen. Mutanten von Mais und Tomate, welche die Fähigkeit zur ABA-Synthese verloren haben, zeigen Viviparie. Diese lässt sich durch Besprühen mit ABA-Lösung verhindern.

Der ausgereifte dormante Samen enthält im Allgemeinen keine nennenswerten Mengen an ABA, so dass die natürliche Keimhemmung nicht direkt mit diesem Hormon in Zusammenhang gebracht werden kann. Reife Samen aber reagieren ähnlich wie junge Embryonen auf äußere Zufuhr von ABA mit Entwicklungsruhe. Bei der Aussaat **keimfähiger** Samen auf einem ABA-haltigen Keimsubstrat findet zunächst eine normale Quellung statt, die Wachstumsphase jedoch, während der der Embryo unter weiterer Wasseraufnahme zum aktiven Streckungswachstum übergeht, wird je nach ABA-Konzentration völlig unterdrückt. Das keimungshemmende Hormon ABA hemmt spezifisch den Übergang von der Quellungsphase zur Wachstumsphase. Der während der Quellungsphase eintretende Aufbruch der Samenschale bleibt durch ABA unbeeinträchtigt, der zu Beginn der Wachstumsphase zu beobachtende Wurzelaustritt (z. B. bei Rapssamen etwa 12 h nach Quellungsbeginn) dagegen wird durch ABA vollständig gehemmt. ABA-behandelte Samen können so in gequollener Form, selbst unter optimalen Keimungsbedingungen (Wasser, Temperatur), für viele Tage in erzwungener Dormanz gehalten werden. Dieser Zustand kann durch Auswaschen des Hormons sehr rasch aufgehoben werden. Die Keimungshemmung durch ABA ist also reversibel.

Auch unter natürlichen Bedingungen kann ABA in der eben geschilderten Weise als Keimungshemmstoff fungieren. Es ist bekannt, dass Tomaten- oder andere Samen innerhalb der Frucht, selbst wenn sie ausgereift sind, nie keimen, nach Entfernen aus der Frucht aber hohe Keimraten aufweisen. Die keimungshemmende Wirkung des

Fruchtfleisches bei Beeren lässt sich neben möglichen weiteren Stoffen auch auf das Vorkommen von ABA zurückführen.

b) Praktische Durchführung und Auswertung:

Lösungen:

ABA 4 µmol/l; aus dieser Stammlösung wird durch Verdünnen mit H_2O deion. folgende Konzentrationsreihe hergestellt**: 2 µmol/l**, **1 µmol/l**, **0,5 µmol/l**, **0,25 µmol/l** (**wie?** Ansatz jeweils in einem **20 ml**-Messkolben; 10 ml Pipetten).

- **H_2O deion**. als Kontrolle
- **Tomatensaft**: für 2 Gruppen wird 1 Tomate (*Solanum lycopersicum*) zerkleinert und der Saft durch Gaze in eine Glasschale gepresst (**Tomatensaft unverdünnt**). Zusätzlich wird pro Gruppe 1 ml davon in einem 10 ml Messzylinder mit H_2O deion. **1:10 verdünnt**.
- **Maracujasaft**: für 2 Gruppen werden 2 Maracujas (*Passiflora edulis*) aufgeschnitten, die Samen mit dem verschleimenden Arillus und der Pulpa aus den Früchten ausgekratzt und der Saft durch Gaze gepresst (**Maracujasaft unverdünnt**). Zusätzlich wird pro Gruppe 1 ml davon in einem 10 ml Messzylinder mit H_2O deion. **1:10 verdünnt** (siehe Tomatensaft).

Versuch:

Je **30 Senfsamen** (*Sinapis alba*) werden in 10 Petrischalen äquidistant auf **3 Lagen Filterpapier** (Ø 70 mm) ausgelegt, welches zuvor mit jeweils **5 ml ABA-Lösung** (0,25; 0,5; 1; 2; 4 µmol/l, siehe oben!), H_2O deion. (Kontrolle) sowie **Tomaten-** und **Maracujasaft** (jeweils unverdünnt und 1:10 verdünnt) gleichmäßig getränkt worden war. Die Petrischalen werden abgedeckt und bei Raumtemperatur im Kursraum bei Tageslicht zum Keimen aufgestellt. Nach etwa **48 Stunden** wird die Keimrate bestimmt und der Entwicklungszustand der Keimlinge protokolliert: Mit Hilfe von Millimeterpapier wird die Länge jeder Keimpflanze von der Wurzelspitze bis zur Insertion der Kotyledonen vermessen und die Länge in einer Tabelle notiert **(Tabelle bitte vor dem Praktikum entwerfen!)**

c) Auswertung:

Die Mittelwerte der Keimpflanzenlängen in den unterschiedlichen Versuchsgefäßen (Ordinate) werden gegen die ABA-Konzentrationen (0 – 4 µmol; Abszisse) aufgetragen. Die Ergebnisse der Versuche mit Tomaten- und Maracujasaft sind in die gleiche Graphik als Balken einzutragen. Kurze schriftliche Zusammenfassung der Ergebnisse!

ENTWICKLUNGSPHYSIOLOGIE AM MODELLSYSTEM *ARABIDOPSIS THALIANA*

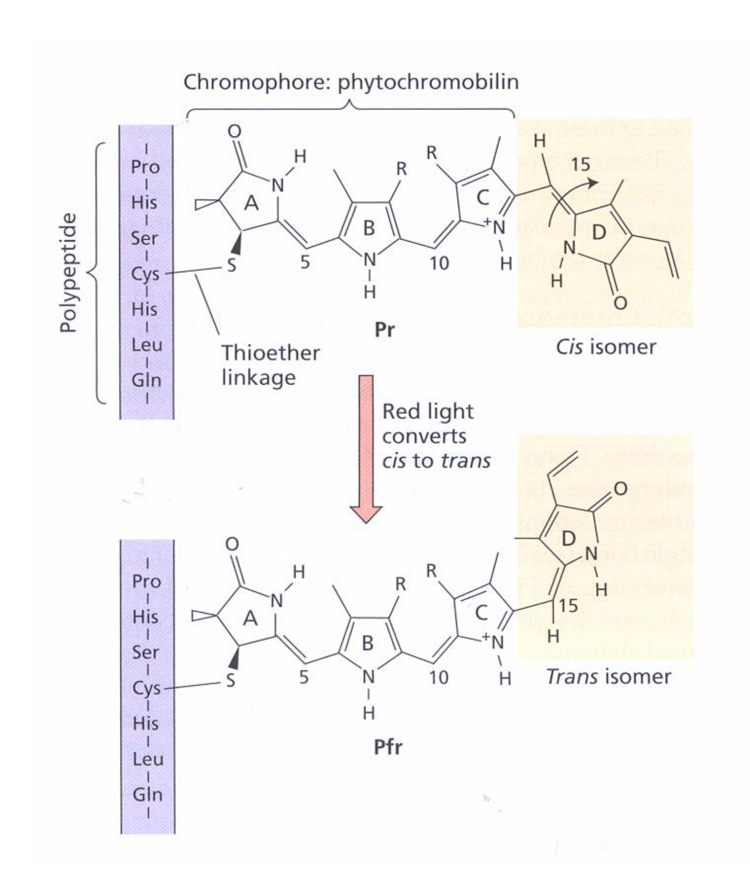
Zur Thematik des Versuchs siehe:
Campbell, S.493-495, 890-891, 977-980, Taiz & Zaiger S. 375-402, 559-566, Schopfer & Brennecke S. 423-448, 465-482

Versuch III/1:
STEUERUNG DES HYPOKOTYL-LÄNGENWACHSTUM DURCH LICHT MITTELS PHYTOCHROM

a) Theoretische Grundlagen und Ziel:
Pflanzen benötigen Licht für die Photosynthese und müssen daher ihr Wachstum zur optimalen Ausnutzung der Lichtquelle hin steuern. Licht ist bei Pflanzen als Umweltfaktor auch ein Signal zur Steuerung von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen. Man kann dies sehr gut beobachten, indem man Pflanzenkeimlinge im Dunkeln und im Licht anzieht. Im Dunkeln etiolieren Pflanzen, d.h. das Hypokotyl streckt sich (Hypokotylelongation), die weitere Blattbildung und Blattausfaltung werden unterdrückt, die Plastiden bilden kein Chlorophyll aus (Etioplasten). Diese Entwicklung im Dunkeln wird als **Skotomorphogenese** bezeichnet, deren Ziel die Verwendung aller Samenressourcen zur schnellstmöglichen Erreichung der Erdoberfläche ist. Sobald die Jungpflanzen Licht wahrnehmen, wird die Hypokotylelongation inhibiert, Blätter werden entfaltet und weitere gebildet und Chlorophyll wird produziert, d.h. die Jungpflanzen de-etiolieren. Diese Licht-abhängige Entwicklung heißt **Photomorphogenese** und erlaubt der Pflanze das schnellstmögliche Ausnutzen der Lichtenergie für die Photosynthese.
In der Pflanzenphysiologie umfasst Licht den elektromagnetischen Wellenlängenbereich von 320 nm (UV-A) bis 760 nm (Dunkelrot). Weißlicht enthält dabei immer Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Zur Wahrnehmung von Licht verfügen Pflanzen über sensorische **Photorezeptorsysteme** für verschiedene Spektralbereiche, wie **Phytochrom** (Rot- und Dunkelrotlichtrezeptoren, 660, 730 nm), Cryptochrom (UV-A- und Blaulichtrezeptoren, 340 – 520 nm) und UV-B Photorezeptoren (280 – 350 nm). Am besten untersucht ist das Phytochromrezeptorsystem und die Rotlichtsignaltransduktion. Phytochrome sind Proteinkomplexe, die aus einem Apoprotein bestehen und einem

gebundenen Chromophor, dem Phytochromobilin. Das Chromophor liegt in Abhängigkeit vom einfallenden Licht in den Konfigurationen cis oder trans vor. Hierbei handelt es sich jedoch um ein Gleichgewicht, das zur cis- oder trans Form verschoben werden kann. Rotlicht aktiviert den Übergang zur trans Form, Pfr, mit einer maximalen Absorption bei 730 nm. Eine Konformationsänderung im Protein aktiviert Phytochrom und Photomorphogeneseantworten werden eingeleitet. Bei Dunkelrot hingegen liegt die biologisch inaktive cis Form vorwiegend vor, Pr, mit einer maximalen Absorption bei 660 nm. Da die Konversion von der aktiven in die inaktive Form und umgekehrt reversibel ist, spricht man auch von **Photoreversibilität**:

$$\mathrm{Pr} \underset{\text{Dunkelrotlicht 730 nm}}{\overset{\text{Rotlicht 660 nm}}{\rightleftarrows}} \mathrm{Pfr}$$



Struktur der Pr und Pfr Formen des Chromophor, welches kovalent mit Phytochrom verbunden ist (aus Taiz & Zaiger).

Pflanzen besitzen unterschiedliche Formen von Phytochromen. Die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion von Phytochromen wurden durch genetische Methoden

aufgeklärt. **Phytochrommutanten** wurden in „Mutanten-Screening“ Verfahren gefunden, d.h. Tausende Nachkommen von mutagenisierten Pflanzen wurden nach Individuen mit veränderten Lichtantworten durchsucht. Solche mutagenisierten Populationen werden künstlich durch Mutageneseverfahren erhalten, z.B. durch chemische Mutagenese mit DNA-verändernden Chemikalien. Statistisch ist es dabei möglich, aus Tausenden Pflanzen mit DNA Mutationen solche zu identifizieren, bei denen ein wichtiges Gen für den gewünschten physiologischen Prozess durch eine Mutation betroffen oder zerstört ist. Für solche genetischen Methoden und insbesondere die anschließende Identifizierung des betroffenen Gens eignen sich Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* am besten (s. Vorlesung, 1. Stunde).

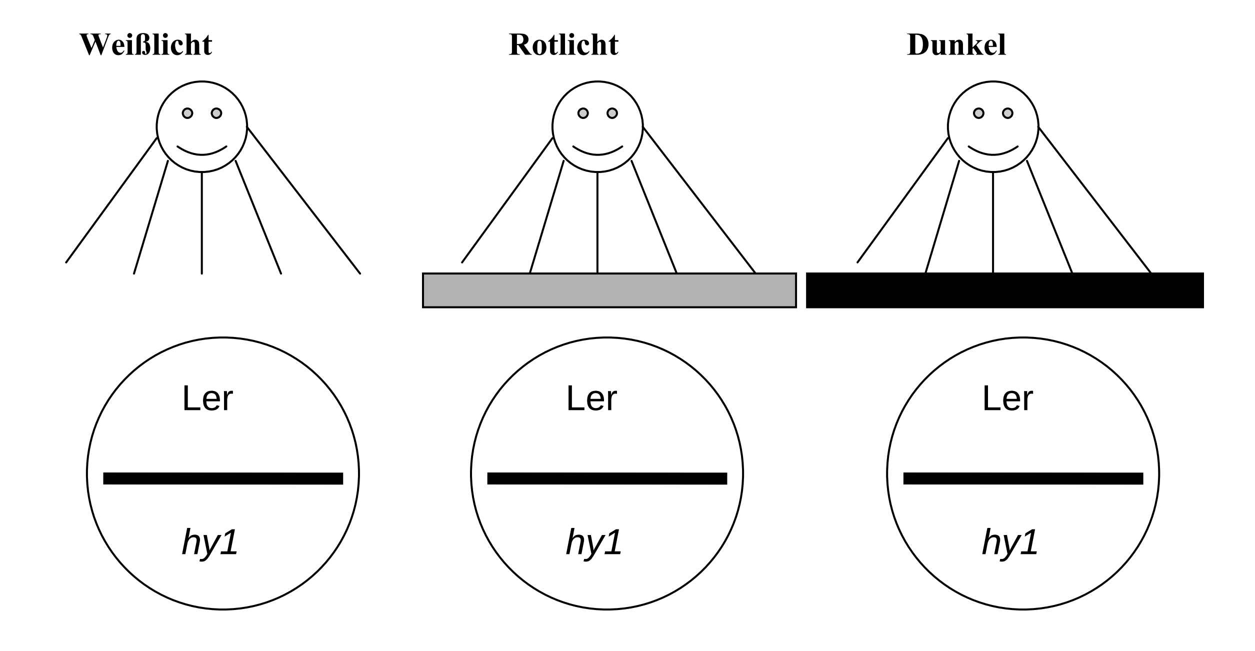
Mutanten der Rotlichtwahrnehmung zeigen im kontinuierlichen Rotlicht einen Phänotyp. Statt der üblichen De-Etiolierung bei Wildtyppflanzen im Rotlicht fand man etiolierte Mutanten, welche nicht auf das Rotlicht reagieren konnten. Hierzu zählt die Arabidopsis Hypokotylelongationsmutante *hy1*, welche einen Defekt in einem Gen der Phytochromobilin Synthese aufweist. *hy1* Mutanten können kein intaktes Phytochrom aufgrund des fehlenden Chromophors produzieren.

Im Folgenden sollen die Lichtantworten von Arabidopsis Keimlingen getestet werden. Hierzu wird das Pflanzenwachstum im Dunkeln verglichen mit dem im kontinuierlichen Weißlicht und kontinuierlichen Rotlicht. Die Beteiligung von Phytochromen wird dabei anhand der Mutante *hy1* (Chromophormutante) im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

b) Praktische Durchführung:

Pflanzenmaterial:

Wildtyp (Ler, Landsberg erecta)	90 Samen
hy1	90 Samen



75 ml Wasser mit 0,6 g Pflanzenagar werden autoklaviert. Festgewordene Agarlösung kann in der Mikrowelle aufgekocht werden. 3 Petrischalen werden mit Agarlösung befüllt. Sterilisierte Samen* werden auf das Agarmedium pipettiert und mit einem Spatel (vorher mit EtOH gereinigt, abgeflämmt und luftgetrocknet) vorsichtig verteilt, jeweils auf der einen Hälfte 30 Ler Samen und auf der anderen Hälfte 30 *hy1* Samen. Anschließend werden die Platten für 1-4 Tage bei 4°C gut verschlossen und dunkel aufbewahrt (Stratifizierung zur gleichmäßigeren Auskeimung, Terminabsprache beachten).

Dann werden die Platten 1 Stunde lang mit Weißlicht bestrahlt, um die Keimung zu induzieren (Arabidopsis benötigt Licht zum Keimen). Anschließend werden die Platten entweder in eine Verdunklungsbox gegeben (**Dunkel**), in eine dunkle Box mit Rotlichtfilterdeckel (**Rotlicht**) oder in eine Box ohne Deckel (**Weißlicht**). Die drei Boxen werden bei 21°C für drei Tage in einen Pflanzenschrank mit kontinuierlichem Weißlicht gestellt.

Am Montag der darauf folgenden Woche werden die Platten aus dem Lichtschrank genommen.

* Sterilisierte Samen werden von Betreuern zur Verfügung gestellt. Die winzigen Samen werden im Eppendorfgefäß mit 6 %iger Na-Hypochloritlösung, 0,1 % Triton-X 8 min lang sterilisiert, durch Zentrifugation wird der Überstand entfernt und durch steriles Wasser ersetzt. Insgesamt wird 5mal mit sterilem Wasser gewaschen und die Samen in 0,1%iger Agarlösung aufbewahrt.

Folgende Phänotypen werden unter dem Binokular festgehalten:

- Farbe der Kotyledonen (grün, gelb, weißlich) und Hypokotylfarbe (weiß, rot-Anthocyane)
- Stellung der Kotyledonen (auseinander, gefaltet, Hypokotylkrümmung?)
- Hypokotyllänge (s. Tafelbild): Die Hypokotyle werden mit Millimeterpapier unter dem Binokular genau vermessen, und die Längen in eine Tabelle eingetragen. Bitte Tabelle vorbereiten !

c) Auswertung:

Die Durchschnittswerte und Standardabweichungen der Hypokotyllängen werden ermittelt (siehe t-test Versuch II/1) und in einem Säulendiagramm graphisch dargestellt. Die Ergebnisse der Phänotypen werden in einer Tabelle für die Lichtqualitäten und Linien dargestellt. Welches Licht inhibiert das Streckungswachstum des Hypokotyls? Welche Photorezeptoren agieren primär? Welche Phänotypen werden durch die Lichtqualität beeinflusst, welche von Phytochromen? Was bedeutet die Anthocyanbildung, die Sie ggf. beobachten?

LITERATUR

Koorneef, M., Rolff, E., Spruit, C.: Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. – Z. Pflanzenphysiol. **100**, 147-160 (1980).

Versuch III/2:

ARABIDOPSIS MUTANTEN ZUR UNTERSUCHUNG VON AUSGEWÄHLTEN ENTWICKLUNGSPROZESSEN

a) Theoretische Grundlagen und Ziel:

Die für jede Pflanzenspezies typische Morphologie, anhand der wir die Spezies bestimmen können, entwickelt sich gemäß eines genetischen Programms. So entwickeln die verschiedenen Pflanzenspezies und –familien die für sie charakteristischen Blattformen, Blattstellungen, Blütenstände und Blütenformen sowie Farben. In der Entwicklungsphysiologie wird das Entwicklungsprogramm der verschiedenen Organe und Zellen von der Initiation, der Determinierung bis zur vollständigen Ausdifferenzierung untersucht. Heute interessiert man sich insbesondere für die Gene und Proteine und deren Wirkungsweise bei Entwicklungsprozessen. In Pflanzen kann dies durchaus kommerzielle Interessen haben. Gerade in der Pflanzenzüchtung (Gemüse, Zierpflanzen) kommen ständig Varietäten mit veränderten morphologischen Merkmalen auf den Markt, die vermutlich zum Teil nur durch Veränderungen in einzelnen Genen hervorgerufen wurden.

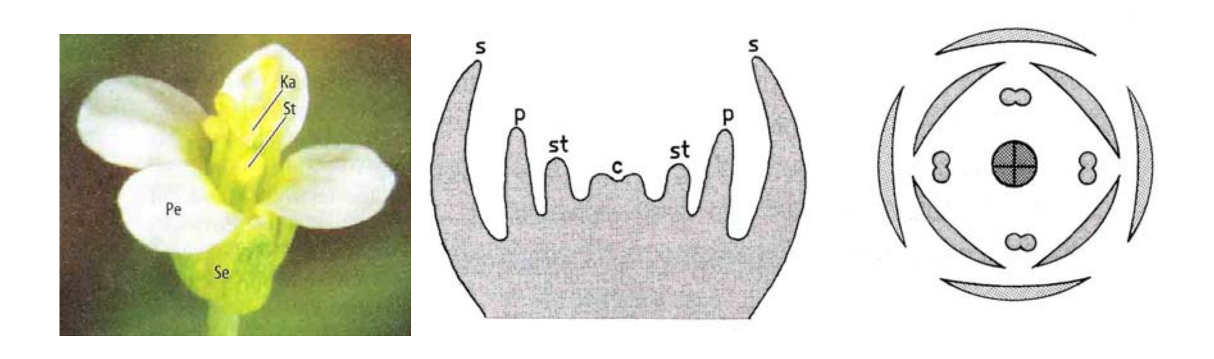
Interessanterweise hat sich gezeigt, dass gerade bei der Initiation und der Determinierung von Zellen und Organen sequenzähnliche, also verwandte Gene (**Homologe**) in evolutionär verschiedenen Pflanzenpezies und –familien agieren. Bei der Herausbildung spezifischer Blüten- und Blattformen kann es sich um die Anreicherung von Veränderungen in der DNA Sequenz von wenigen **Schlüsselgenen** handeln, denen eine grundlegende Funktion bei dem betreffenden Prozess zukommt. Um Verwandtschaftsverhältnisse zwischen verschiedenen Pflanzenarten zu bestimmen und Stammbäume zu erstellen, verlässt man sich daher nicht mehr auf rein morphologische Kriterien, sondern zieht molekulare Daten hinzu. Hier eignen sich konservierte Gene der Photosynthese oder ribosomale DNA besonders gut. Trotz großer morphologischer Unterschiede lassen sich einzelne Arten durch molekulare Bestimmung ihrer Verwandschaftsverhältnisse zum Teil in einem Stammbaum neu einordnen.

Schlüsselgene der Pflanzenentwicklung hat man insbesondere anhand des Modells *Arabidopsis thaliana* untersucht. Molekulargenetische Methoden waren sehr wichtig zum Auffinden von Schlüsselgenen in Entwicklungsprozessen. Wie bereits im vorangegangenen Versuch erläutert wurde, werden dazu Mutantenpopulationen erstellt. In der Entwicklungsphysiologie werden die mutagenisierten Populationen nach Individuen mit veränderter Morphologie durchsucht. Diese Mutanten müssen zunächst

genetisch näher bestimmt werden. Eine zu klärende Frage betrifft die Ausprägung des Phänotyps: Die Mutation kann **rezessiv** wirken, d.h. nur im **homozygoten** Zustand des mutanten Allels ist der Phänotyp zu erkennen (**Allel** = Zustand des Gens). Ist hingegen ein Wildtyp-Allel vorhanden (**heterozygoter** Zustand) zeigt sich die phänotypische Veränderung durch das mutante Allel nicht mehr. Auf der anderen Seite kann sich die Mutation **dominant** auswirken, d.h. eine Kopie des mutanten Allels reicht für die Ausprägung des Phänotyps aus in Anwesenheit des Wildtyp-Allels. In der Regel beruhen rezessive Allele auf einer Mutation, welche die Funktion des Gens zerstört (**Funktionsverlust**), zum Beispiel kein Protein, defektes Protein. Hingegen beruhen dominante Allele häufig auf Mutationen, welche neue Funktionen für das Gen gewinnen (**Funktionsgewinn**), zum Beispiel durch Aminosäureaustausche, die eine Funktionsänderung bewirken, oder durch veränderte Mengen an produziertem Protein. Um rezessive oder dominante Ausprägung von mutanten Allelen zu überprüfen, kann eine **Rückkreuzung** hilfreich sein. Dabei wird die Mutante mit dem elterlichen Wildtyp gekreuzt. Jetzt gelten die Mendelschen Regeln. Ist der Phänotyp bei den Nachkommen (F1) sichtbar, ist die Mutation dominant, ansonsten voraussichtlich rezessiv. In der zweiten Generation (F2) spaltet der Phänotyp auf (**Segregation**). Bei einer rezessiven Mutation liegt das Verhältnis von Mutante:Wildtyp bei 1:3 (= 1:2:1, homo mut:het:homo wt). Bei einer dominanten Mutation liegt das Verhältnis von Mutante:Wildtypphänotyp bei 3:1 (= 1:2:1, homo mut:het:homo wt). Manche Mutanten können im homozygoten Zustand vermehrt werden, d.h. die Mutation verhindert die Samenbildung nicht. Mutanten mit schweren Entwicklungsstörungen oder sterile Mutanten können über heterozygote Pflanzen vermehrt werden, vorausgesetzt die Mutation ist rezessiv.

Im Praktikum werden Ihnen vier Mutanten vorgestellt. Eine Mutation betrifft die **Spezifikation von Blatthaaren (Trichome)** in der Epidermis. Einzelne Battepidermiszellen entwickeln sich zu Trichomen, andere hingegen nicht. Dies geschieht in einem Muster auf der Blattoberfläche. Für die Ausbildung von Trichomen sind mehrere Schlüsselgene identifiziert, eines davon ist ***GLABRA1***. Der Name glabra bedeutet „glatt ohne Haare“. *glabra1* Mutanten bilden keine Trichome aus. Das Protein GLABRA1 ist also für die Ausbildung von Trichomen essentiell. Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor, der für die Determinierung von Epidermiszellen zu Trichomen wichtig ist.

Drei weitere Mutanten haben eine veränderte **Spezifikation von Blütenorganen** und können nicht alle Blütenorgane ausbilden. Man spricht im allgemeinen von vier verschiedenen Blütenorganen, die in vier Wirteln (Stellungen) ausgebildet werden. Das erste Wirtel enthält die grünen Kelchblätter, das zweite Wirtel die meist bunten Kronblätter, das dritte Wirtel die Staubblätter und das vierte Wirtel die Fruchtblätter. Anzahl und Verwachsung der Blütenorgane in den Wirteln sind art- bzw. familienabhängig. Im Wildtyp Arabidopsis erfolgt die Ausbildung der Blütenorgane entsprechend des folgenden Blütendiagramms:



Die Arabidopsis Blüte: Links, Photo. Mitte, Schematischer Längsschnitt durch das Blütenmeristem mit den Organanlagen. Rechts, Blütendiagramm, Anordnung der Blütenorgane im Querschnitt (aus Schopfer & Brennicke).

Bei den Blütenorganen handelt es sich um:

Se (Sepalen) – Kelchblätter

Pe (Petalen) – Kronblätter

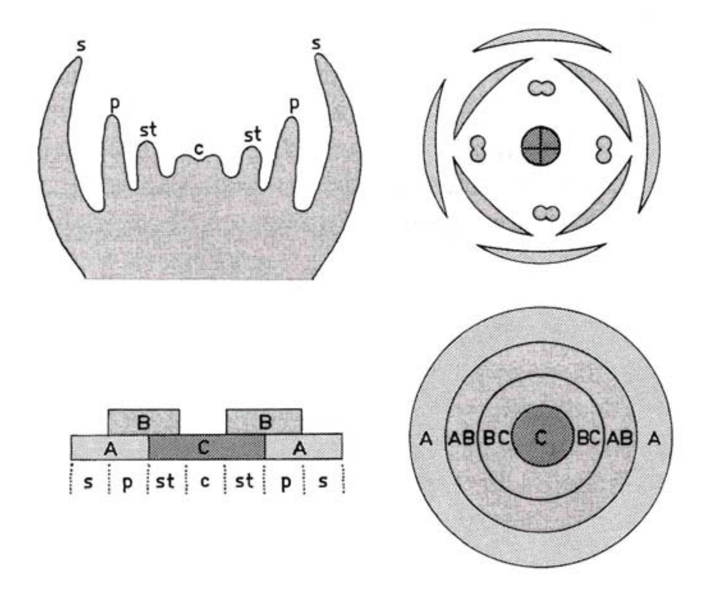
St (Stamina) – Staubblätter

Ka (Karpelle) - Fruchtblätter

In den Mutanten ***agamous*** (*ag*), ***apetala2*** (*ap2*) und ***apetala3*** (*ap3*) sind zwar alle Wirtel vorhanden, aber die Identität der Blütenorgane in den Wirteln ist betroffen (**homöotische Mutation**). *ag* Mutanten haben nur Kelchblätter und Kronblätter. Es fehlen Staub- und Fruchtblätter. Die Blütenorgane der dritten und vierten Wirtel haben erneut die Identität der Blütenorgane der ersten beiden Wirtel. In *ag* Mutanten scheint außerdem das vierte Wirtel indeterminiert zu sein, da sich die Abfolge der Wirtel wiederholt. *ap2* Mutanten fehlen Kelch- und Kronblätter. *ap3* Mutanten haben Kelchblätter nicht nur im ersten sondern auch im zweiten Wirtel und dadurch keine Kronblätter. Anstelle der Staubblätter finden sich weitere Fruchtblätter, wenn auch

morphologisch veränderte und verwachsene. Zum Teil sind die hier beschriebenen Phänotypen nur inkomplett ausgebildet.

Von den Untersuchungen an diesen Mutanten wurde ein vereinfachtes Modell zur Determinierung von Blütenorganen erstellt, das sog. ABC Modell:



ABC-Modell der Blütenorganidentitätsgene: A-Funktion = *APETALA2*; B-Funktion = *APETALA3*; C-Funktion = AGAMOUS. ABC Gene werden entsprechend der unteren beiden Schemen in den vier Wirteln exprimiert. Entsprechend des Modells ergibt sich, dass die vier Blütenorgane vier verschiedene ABC Genkonstellationen benötigen. Fällt ein Gen aus, ergeben sich die jeweils anderen Konstellationen, die dann zu den homöotischen Veränderungen führen. (aus Schopfer & Brennicke).

Se (Sepalen) – Kelchblätter	**A**
Pe (Petalen) – Kronblätter	**AB**
St (Stamina) – Staubblätter	**BC**
Ka (Karpelle) – Fruchtblätter	**C**

Ziel ist hier, die entwicklungsspezifischen Phänotypen von vier Mutanten zu erkennen und zu beschreiben (*glabra1*, *agamous*, *apetala2*, *apetala3*), sich die zugehörige Genetik zu überlegen und Erklärungen für die Phänotypen herzuleiten.

b) Praktische Durchführung:

Sie erhalten Töpfe mit blühenden Arabidopsispflanzen. Es handelt sich dabei jeweils um unterschiedliche Linien (Nachkommen derselben Mutterpflanze). Diese sollen Sie anhand der Fragen der Auswertung näher charakterisieren und die entsprechenden Zeichnungen anfertigen.

c) Auswertung:

1) Bei welchen Töpfen handelt es sich um Wildtyp, *glabra1*, *agamous, apetala2* und *apetala3*? Zeichnen sie die charakteristischen Phänotypen verglichen mit dem Wildtyp auf. Woran haben Sie die Mutanten erkannt?
2) Erarbeiten Sie Blütendiagramme für die analysierten Blütenmutanten, vergleichen Sie mit dem Wildtyp und diskutieren Sie das ABC Modell.
3) Sind die Linien homozygot (keine Segregation) oder heterozygot (Segregation)? Wenn Sie eine Segregation feststellen, wie ist das Segregationsverhältnis? Was leiten Sie daraus ab? Wie müssen die Linien vermehrt werden fürs Praktikum im nächsten Jahr und wie kann man die korrekten Linien auswählen und überprüfen?
4) *glabra1* und *ap2* Mutanten können homozygot vermehrt werden, *ag* und *ap3* nicht. Weshalb?
5) Angenommen Sie wollten Samen von einer segregierenden und einer nicht segregierenden Linie von *glabra1* erhalten. Wie würden Sie vorgehen ausgehend von einer homozygot vorliegenden *glabra1* Pflanze?
6) Arabidopsis kann durch Selbstung vermehrt werden (keine manuelle Operation notwendig). Wird genetisch gearbeitet, müssen die Organismen jedoch häufig gekreuzt werden. Bei Arabidopsis werden dafür zunächst geschlossene Blüten mit hervorstehendem Karpell gewählt. Die Blüten werden mit einer Pinzette vorsichtig geöffnet und Staubblätter entfernt. Kelch- und Kronblätter können stehen bleiben. Wichtig ist das zentrale Karpell. Mit der Pinzette werden von einer reifen Blüte Staubblätter abgezupft und der Pollenstaub auf das behaarte Stigma getupft. Den Vorgang unbedingt unter dem Binokular verfolgen! Falls verschiedene Linien miteinander gekreuzt werden, muß die Pinzette ständig in Alkohol sterilisiert werden, um Fremdpollenbestäubung zu verhindern.

Konventionen für die Bezeichnung von Arabidopsis Allelen/Genen/Proteinen:

a. das Gen, Wildtypallel *GLABRA1*
b. das Protein GLABRA1
c. die rezessive Mutante *glabra1*.

LITERATUR:

Oppenheimer D.G., Herman P.L., Sivakumaran S., Esch J., Marks M.D.: A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. – Cell **67**, 483-493 (1991).

Bowman, J.L., Smyth, D.R., Meyerowitz, E.M.: Genes directing flower development in *Arabidopsis*. – Plant Cell **1**, 37-52 (1989).

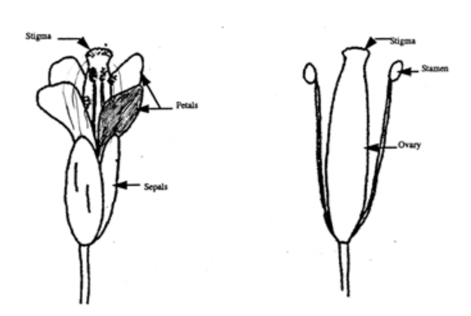


Abb.: Reife Arabidopsis Blüte im Schema. Sepalen und Petalen werden mit einer Pinzette abgetrennt. Die **Staubblätter zur Bestäubung** können dann mit einer Pinzette an der unteren Basis abgezupft werden. Reife Staubblätter sind tiefgelb und tragen Pollenkörner, die unter dem Binokular erkennbar sein sollten.



Abb.: Unreife Arabidopsisblüte zur Befruchtung. Sepalen und Petalen umschließen Staub- und Fruchtblätter. Das behaarte Stigma steht hervor. Sepalen und Petalen werden mit einer Pinzette entfernt oder nach unten geknickt. Die unreifen Staubblätter, die grünlich und etwa nur halb so lang wie Petalen sein sollen, werden mit einer Pinzette abgetrennt. Dadurch wird das **Stigma freigelegt** und kann bestäubt werden.

Versuch III/3:

NACHWEIS DER AKTIVITÄT EINES TRANSGENS IN GENETISCH VERÄNDERTEN ARABIDOPSIS PFLANZEN

a) Theoretische Grundlagen und Ziel:

1. Bestimmung des Genexpressionsmusters mittels Reportergentests

Die Funktionsweise von Genen wird heute in der Regel durch Standardexperimente zunächst bestimmt. Hierzu bestimmt man häufig zuerst, wann (in welchem Stadium der Entwicklung oder einer physiologischen Behandlung), wo (in welchen Zellen, Geweben, Organen) und wie stark ein Gen aktiv ist, d.h. mRNA gebildet wird. Diese Aktivitäten sind charakteristisch für alle Gene. Die Gesamtheit der Aktivitäten eines Gens bezeichnet man auch als **Genexpressionsmuster**. Das Genexpressionsmuster wird vom regulatorischen Bereich des Gens bestimmt, insbesondere des Promoters. Bei der Untersuchung der Funktionsweise von Genen in einem biologischen Prozess ist es sinnvoll, das Genexpressionsmuster während des biologischen Prozesses zu bestimmen. Im Allgemeinen geht man von der Annahme aus, dass Gene dann exprimiert werden, wenn sie auch eine Funktion erfüllen sollen. Neben der direkten Untersuchung von isolierter RNA beruht eine alternative Methode auf der Verwendung eines **Promoter-Reportergentests**. Als Reportergen bezeichnet man ein Gen, dessen Proteinprodukt direkt oder indirekt durch einen enzymatischen Test in den Zellen leicht nachzuweisen ist. Die Aktivität des Reportergens hängt dabei von der Regulation des Promoters ab, d.h. die Reporteraktivität soll die Expressionsaktivität des eigentlich zu untersuchenden Genpromoters wiederspiegeln. Dabei wird die Promoterregion des zu untersuchenden Gens mit einem Reportergen fusioniert (durch entsprechende Klonierung in binären Vektoren, die sowohl in *Escherichia coli* als auch *Agrobacterium tumefaciens* repliziert werden können). Durch Agrobakterien-vermittelte Transformation wird die Promoter-Reportergenfusion als **Transgen** in Pflanzen eingebracht (**Pflanzentransformation**). Die Aktivität des Promoters bestimmt, wann, wo und wie stark das Reportergen in diesen genetisch veränderten Pflanzen exprimiert wird. Einfach und preisgünstig ist der Reportertest mittels des Reportergens für die β-Glucuronidase (abgekürzt **GUS**), welches vorwiegend in Pflanzen zur Anwendung kommt. In Bakterien, Hefe und Säugerzellen ist der Reporter mittels β-Galactosidase geläufiger. Das *GUS* Gen stammt ursprünglich aus *E. coli*. Pflanzen haben in der Regel keine vergleichbare interne GUS Aktivität. GUS spaltet β-Glucuronide durch Hydrolyse. Im GUS Test werden spezielle

käufliche Substrate (β-Glucuronide) gespalten, deren Produkte kolorimetrisch nachweisbar sind, wie das x-Glucuronid (x-Gluc). Dabei entsteht ein Indoxylderivat, das nach unspezifischer Oxidation als blauer Farbstoff präzipitiert.

Abb.: GUS Reaktion mit x-Gluc. Der erste Schritt erfolgt spezifisch und wird vom GUS Enzym katalysiert. Die Zwischenstufe kann in den Zellen diffundieren. Der zweite Schritt erfolgt spontan durch Oxidation und wird durch Hexacyanoferrat (III) beschleunigt. Es entsteht ein blaues Präzipitat.

2. Verstärkte und konstitutive Expression von Genen in transgenen Pflanzen („Überexpression“)

Das Genexpressionsmuster kann künstlich beeinflusst werden, zum Beispiel indem man ein Gen in allen Zellen oder ständig stark überaktiviert (= **konstitutive Genexpression oder Überexpression**). Durch konstitutive oder Überexpression kann ein beliebiges Gen (pflanzeneigenes oder auch ein fremdes Gen aus einem anderen Organismus) also in allen Zellen unabhängig von seinem normalen Expressionsmuster aktiviert werden. Mit Überexpressionsstudien untersucht man zum Beispiel, was passiert, wenn ein Gen nicht mehr nur in bestimmten Zellen exprimiert wird, sondern auf einmal in allen Zellen. Dies kann helfen, die Genfunktionen näher zu charakterisieren. Man kann durch konstitutive Expression auch erreichen, dass Pflanzen fremde Gene aus eigentlich anderen Organismen ständig aktivieren, zum Beispiel Resistenzfaktoren gegen Pathogene. Um

einen Überexpressionseffekt zu erreichen, muß das gewünschte Gen zunächst mit einem konstitutiven Promoter fusioniert (Klonierung ähnlich wie oben) und in Pflanzen als **Transgen** eingeführt werden. In Pflanzen verwendet man im Labor im allgemeinen den **35S Promoter** des Blumenkohl Mosaikvirus (Cauliflower Mosaic Virus, **CaMV**). Der 35S Promoter wurde vor zwanzig Jahren als quasi konstitutiv in fast allen getesteten dikotyledonen Pflanzen beschrieben. Seither ist der CaMV 35S Promoter in vielen transgenen Laboransätzen zur Routineüberexpression verwendet worden. In transgenen Pflanzen, die für kommerzielle Anwendungen in der Landwirtschaft bestimmt sind, wird der 35S Promoter jedoch nicht verwendet.

Hier werden Ihnen eine nicht-transgene Linie und zwei verschiedene transgene Arabidopsis Linien vorgestellt. Einmal ist das GUS Gen hinter dem 35S Promoter exprimiert, das andere Mal hinter einem wurzelspezifischen Promoter. Sie sollen durch GUS Tests die GUS Färbungen beobachten, bestimmen, wie stark und in welchen Pflanzenteilen die Promoteren aktiv sind, und die Linien entsprechend des Muster zuordnen.



b) Praktische Durchführung:

Vorbereitung der Lösungen (Berechnung vor dem Praktikum):

Der GUS Aktivitätstest wird in einer GUS Pufferlösung durchgeführt, von der Sie insgesamt 1 ml benötigen. Die GUS Pufferlösung wird durch Mischung mehrerer konzentrierter Ausgangslösungen und Verdünnung in wässriger Lösung hergestellt. Überlegen Sie sich, wozu das gut sein könnte. Berechnen Sie im folgenden, welche Mengen an Stammlösung und an dest. Wasser Sie zusetzen müssen, damit Sie am Ende 1 ml GUS Pufferlösung haben.

Stammlösungen und deren Konzentrationen	**Gewünschte Endkonzentrationen in GUS Pufferlösung**	zu pipettierendes Volumen für **1 ml** GUS Pufferlösung
1 M Na_2HPO_4	} 100 mM Puffer	57 µl
1 M NaH_2PO_4	pH 7,0	43 µl
100 mM $K_4[Fe(CN)_6]$ (Fe II)	2 mM	?
100 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ (Fe III)	2 mM	?
20 % Triton-X (Detergenz)	0,2 %	?
GUS Substrat x-Gluc 100 mM	2 mM	?

Pflanzenmaterial: mehrere Tage alte Pflanzenkeimlinge auf steriler Platte mit Pflanzenmedium (sind bereits angezogen):

* p35S-GUS Pflanzen, transgen
* Wurzelpromoter-GUS Pflanzen, transgen
* Wildtyp, nicht transgen

Die drei Linien werden im Kurs als A, B und C bezeichnet und sollen von Ihnen zugeordnet werden.

ACHTUNG: TRANSGENE PFLANZEN IN AUTOKLAVIERMÜLL ENTSORGEN !!!!

Histochemischer GUS Test

Je 300 µl GUS Lösung werden in drei Eppendorfgefäße gegeben für die drei Pflanzenlinien A, B, C. Gekeimte Pflanzen werden mit einer Pinzette in die GUS Lösung gegeben. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C im Dunkeln bis Blaufärbung klar zu erkennen ist.

Anschließend wird die GUS Inkubationslösung mit einer Pasteurpipette entfernt und durch Wasser ersetzt. Die Keimlinge werden zurück auf die Platte mit Medium gegeben, ausgebreitet oder in einem Wassertropfen aufbewahrt, um Austrocknen zu verhindern. Unter dem Binokular werden die Pflanzen untersucht. Die Organe und Gewebe mit Blaufärbung werden bei größtmöglicher Vergrößerung betrachtet. Die Blaufärbungen werden in Zeichnungen detailliert festgehalten. Es kann auch photografiert werden.

Auswertung

Die histochemischen GUS Befunde werden aufgezeichnet und verglichen. Welche Transgene enthalten die Linien A, B und C?

Diskutieren Sie, ob der 35S Promoter konstitutiv in Arabidopsis Keimlingen exprimiert wird. In welchen Geweben sind die Promotoren aktiv? Weshalb könnte der CaMV einen konstitutiv in Pflanzen exprimierten Promoter benötigen? Was könnte die Funktion eines wurzelspezifisch exprimierten Gens sein?

LITERATUR:

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., and Bevan M.W.: GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.- EMBO J. 6, 3901–3907 (1987).

Versuch IV

IONENAUFNAHME VON PFLANZEN UND PUFFERKAPAZITÄT DES BODENS

Zur Thematik des Versuchs siehe:
Campbell, S. 895-904; 919-925; Lüttge et al. S. 372, 373; 467-482; Mengel, S. 183-250; Nultsch, S. 273-280; Richter, S. 31-62.

Versuch IV/1:
SELEKTIVE IONENAUFNAHME

a) Theoretische Grundlagen:

Zellen können sowohl Ionen als auch ungeladene Moleküle selektiv aus dem umgebenden Medium aufnehmen. Bei Pflanzen kann die selektive Ionenaufnahme durch pH-Verschiebungen im Nährmedium verfolgt werden. Überwiegt die Kationenaufnahme, so werden zum Ladungsausgleich Protonen abgegeben. Das Medium wird dadurch sauer. Umgekehrt wird bei bevorzugter Anionenaufnahme das Nährmedium durch die Abgabe von Hydrogencarbonat-Ionen (HCO_3^-) basisch. Derart induzierte pH-Veränderungen lassen sich besonders drastisch am Beispiel des stickstoffhaltigen Ionenpaars NH_4^+ und NO_3^- zeigen. Beide Ionen werden von Pflanzen besonders leicht aufgenommen. Ammoniumernährung wirkt auf das Außenmedium pH-erniedrigend, Nitraternährung dagegen pH-erhöhend. Ammoniumsalze [NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$] werden deshalb auch als physiologisch saure, Nitrate (z.B. KNO_3) als physiologisch basische Salze bezeichnet. Im vorliegenden Versuch wird eine Zellsuspension der Grünalge *Scenedesmus vacuolatus* mit $(NH_4)_2SO_4$ bzw. mit KNO_3 versetzt und etwa **2-3 h** inkubiert. Die zu erwartenden Änderungen des pH-Wertes der ungepufferten Lösungen werden mit einem pH-Meter gemessen.
Grundsätzlich kann selektive Stoffaufnahme die Folge von zwei verschiedenen Ursachen sein:
a) Das Plasmalemma ist für verschiedene Ionen gleichermaßen durchlässig (Diffusion oder Permeation). Bis zum Konzentrationsausgleich (außen = innen) werden sie gleich gut aufgenommen. Für alle Ionen, die im Zellinnern sehr rasch weiterverarbeitet werden

(z.B. Stickstoff enthaltende Ionen), bleibt jedoch ein Konzentrationsgradient erhalten. Nur für diese Ionen beobachtet man eine große Nettoaufnahme, was zum selektiven Verschwinden eines Ions aus dem Außenmedium führt.

b) Das Plasmalemma ist nur für bestimmte Ionen durchlässig; diese werden mit Hilfe von Transportproteinen (Translokatoren, Carriern) durch die Biomembran transportiert. Es werden zwei Formen von spezifischem Transport unterschieden:
1) die katalysierte Diffusion (oder der passive Trägertransport), die wiederum nur zu einem Konzentrationsausgleich führt: Hier folgt der Ionentransport dem chemischen bzw. elektrochemischen Potentialgradienten des Substrats.
2) der aktive Transport, der unter Energieverbrauch (ATP) auch gegen einen Konzentrationsgradienten zu einer Ionenanreicherung im Zellinnern führt (siehe dazu auch Campbell S. 896-898).

Die selektive Ionenaufnahme bei *Scenedesmus* erfolgt über den aktiven Transport. Das hierzu benötigte ATP wird durch Veratmung von Glukose (aus Stärke) gewonnen; sind die Zellen durch eine vorangegangene Dunkelperiode stärkeverarmt oder -frei, so kann im Außenmedium angebotene Glukose aufgenommen und veratmet werden. Diese Zellen können dann im Vergleich zu Zellen ohne Glukoseangebot mehr Ionen aufnehmen. Wenn die Aufnahmegeschwindigkeit von Ionen durch Zugabe von Glukose ins Nährmedium erhöht wird, so ist dies ein Hinweis für die Beteiligung von aktivem Transport bei der selektiven Ionenaufnahme.

<u>pH-Messung:</u>

Die Messung des pH-Wertes erfolgt in der Regel mit Farbindikatoren oder mit einer Glaselektrode. Mit der Glaselektrode (Einstabmesskette) wird eine Potentialdifferenz gemessen, die sich zwischen einer Lösung bekannter Wasserstoffionenkonzentration (= Füllung der Glaselektrode) und der zu messenden Außenlösung einstellt. Die Ausbildung des Potentials beruht auf einem H^+/Na^+-Ionenaustauschvorgang zwischen der gequollenen Schicht eines Spezialglases (Zapfen am unteren Ende der Elektrode; Glaselektrode stets wässern!) und den beiden angrenzenden Lösungen. Diese Glaselektrode steht mit einer Vergleichselektrode (gesättigte Kalomelelektrode) in Verbindung, deren Potential konstant und pH-unabhängig ist. Die zwischen den beiden Elektroden vorhandene Spannung ist ein Maß für den pH-Wert der Außenlösung und wird mit einem Voltmeter gemessen. Mit der Glaselektrode kann kein absoluter pH-

Wert bestimmt werden; Das Gerät wird daher vor der Messung mit Eichpuffern eingestellt.

b) Praktische Durchführung:

1. Eichung des pH-Meters:

Die Eichung des pH-Meters (Eichpuffer pH ~ 7.0 und pH ~ 4.0) und die anschließende pH-Messung erfolgen nach der am Arbeitsplatz aushängenden Bedienungsanleitung. Zusätzlich sind folgende Punkte zu beachten:
Die Eichpufferlösungen werden zur besseren Handhabung vor der Eichung in 25 ml Bechergläser eingefüllt, danach wieder in die Vorratsgefäße zurück gegossen.
Die Glaselektrode (**leicht zerbrechlich und teuer!**) wird vor jeder Benutzung mit H_2O deion. abgespült und anschließend vorsichtig mit weichem Papiertuch getrocknet. Beim Eich – und Messvorgang ist darauf zu achten, dass die Elektrode genügend tief in die Eich- bzw. Messlösung eintaucht. Der pH-Wert wird abgelesen, nachdem sich die Anzeige stabilisiert hat (kann mehrere Minuten dauern!). Der Vorgang lässt sich durch leichtes Bewegen des Probegefäßes beschleunigen und stabilisieren. **Zwischen den Messungen ist die Elektrode stets in H_2O deion. eingetaucht aufzubewahren.**
Die Eichung wird **vor** dem Praktikum vom **Kursleiter/in** durchgeführt.

2. Ansetzen der Algensuspension und pH-Messungen:

Die in einem Klimaschrank bei Licht und 27° C angezogenen Algen werden vom Betreuer/in am Vorabend des Versuchstages dem Klimaschrank entnommen (100 ml Suspension pro Gruppe) und über Nacht im Kursraum in einem mit Alufolie verdunkelten Erlenmeyerkolben belüftet auf einen Schüttler gestellt (**warum** ?). Am Morgen wird die Algensuspension vom Kursleiter/in 2 min lang bei 600 x g (~2200 U/min) zentrifugiert. Die zentrifugierten Algen werden in 55 ml H_2O deion. resuspendiert, in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit Alufolie verdunkelt bis zum Versuchsbeginn belüftet auf den Schüttler gestellt. Anschließend werden 4 Erlenmeyer-Kolben (100 ml) mit folgenden Lösungen beschickt:

1: 4 ml $(NH_4)_2SO_4$-Lösung + 4 ml H_2O deion.
2: 4 ml $(NH_4)_2SO_4$-Lösung + 4 ml Glukose-Lösung
3: 4 ml KNO_3-Lösung + 4 ml H_2O deion.
4: 4 ml KNO_3-Lösung + 4 ml Glukose-Lösung

Die Konzentrationen der Lösungen sind jeweils **2%ig**.

Anschließend werden nach Schütteln 12 ml der Algen-Vorratssuspension mit einer 10 ml Messpipette in den Erlenmeyer **1** gegeben und davon sofort der Anfangs-pH-Wert bestimmt (auf 2 Dezimalstellen genau!). Zur pH-Einstellung und -Messung werden die Proben zwecks besserer Handhabung der pH-Messelektrode in 25 ml-Bechergläser (beschriftet mit der Nummer der jeweiligen Algensuspension) gegossen. Die pH-Wert-Messungen werden durch vorsichtiges Schütteln des Becherglases durchgeführt, der End-pH-Wert muss dabei mindestens 30 sek stabil sein. Unmittelbar nach der ersten pH-Messung wird der Erlenmeyerkolben nummeriert und mit Alufolie verdunkelt. Auch die Alufolie wird außen mit der gleichen Nummer beschriftet. Dann wird er auf einen Schüttler gestellt und bei Stufe 100/min geschüttelt (Zeitwert Null, Anfangs-pH-Wert). Falls dieser Wert > 6.3 oder < 5.8 ist, wird er mit 0,01 oder 0.0025 mol/l HCl oder NaOH auf ~ pH 6.0 eingestellt. Ebenso wird mit Suspension **2** verfahren.
Auch von den Proben **3** und **4** werden gleich nach Zugabe der 12 ml Algensuspension die pH-Werte bestimmt und durch Zugabe von 3-4 Tropfen 0,01 mol/l HCl auf ~ pH 4,5 eingestellt.
Für jede pH-Messung werden die Suspensionen in die jeweiligen Bechergläser überführt und danach in den Erlenmeyer-Kolben zurück gegossen. Dieser wird wieder mit der Alufolie verdunkelt und auf den Schüttler zurückgestellt. In Abständen von 30 min wird der pH-Wert der Proben dann noch vier-fünfmal gemessen. Der Messvorgang dauert also mindestens 2 – 2 ½ h!

Vor dem Praktikum:
Erstellen Sie bitte eine Tabelle für die pH-Messergebnisse entsprechend den Inkubationsbedingungen und in Abhängigkeit von der Zeit.

c) Auswertung:
Die gemessenen Veränderungen der pH-Werte (Ordinate!) sind in Abhängigkeit von der Zeit (Abszisse!) graphisch darzustellen. In einer kurzen Zusammenfassung sind die Versuchsergebnisse zu interpretieren.

Versuch IV/2:

PUFFERKAPAZITÄT DES BODENS

a) Theoretische Grundlagen:

Der pH-Wert des Bodens beeinflusst die chemischen, physikalischen und biologischen Bodeneigenschaften und damit das Pflanzenwachstum. Erheblichen Einfluss hat diese durch Azidität bzw. Basizität bewirkte Bodenreaktion auf die Verfügbarkeit einiger Nährstoffe. So geht die Verfügbarkeit der meisten Spurenelemente (B, Mn, Co, Zn) mit zunehmendem pH-Wert zurück. Bei K, Ca und Mg führt dagegen abnehmender pH-Wert zu einem Mangel an diesen Elementen. Unter den Nährstoffanionen geht das pflanzenverfügbare $H_2PO_4^-$ mit steigendem pH-Wert zunehmend in HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} über, die wegen ihrer geringen Löslichkeit **weniger** $(HPO_4)^{2-}$ bzw. **nicht** $(PO_4)^{3-}$ verfügbar sind.

Die Ansprüche der Pflanzen an den pH-Wert des Bodens variieren. Hafer und Kartoffel sind Beispiele für Pflanzen, die schwach saure Böden bevorzugen, während Gerste und Luzerne auf basischen Böden besser gedeihen. Die meisten unserer Kulturpflanzen erreichen ihre beste Entwicklung auf ± neutralen Böden (pH 6,5 – 7,5).

Wegen der Wirkungen auf die Nährstoffverfügbarkeit reagieren Pflanzen und Bodenorganismen sehr empfindlich gegenüber plötzlichen und starken pH-Änderungen. Die Fähigkeit des Bodens, solche pH-Änderungen abzupuffern, ist daher für die Pflanzenernährung von großer Wichtigkeit. Unter Pufferung versteht man die Fähigkeit des Bodens, einer Änderung der Wasserstoffionen- oder Hydroxidionenkonzentration Widerstand zu leisten. Wässrige Bodenauszüge sind in dieser Hinsicht vergleichbar mit den aus der Chemie bekannten Pufferlösungen: Versetzt man sie mit Säure oder Lauge, so ändert sich ihr pH-Wert sehr viel langsamer als der einer ungepufferten Lösung.

Besondere Bedeutung für die Bodenreaktion hat die Pufferung gegen H^+-Ionen. Im Boden werden durch zahlreiche biologische Prozesse Protonen freigesetzt (z.B. auch bei der Stoffaufnahme durch die Pflanzenwurzel, vgl. Versuch IV/1). Hinzu kommt der anthropogen bedingte Eintrag saurer Immissionen, zu denen der „saure Regen“ gehört. Zunehmende Bodenversauerung führt zu verstärkter Nährstoffauswaschung und Freisetzung toxischer Ionen.

Wichtige Puffersysteme im Boden sind die mineralischen und organischen Bodenkolloide, wozu in erster Linie Tonminerale und Huminsäuren bzw. Humate zählen. Sie binden ankommende H^+- bzw. OH^--Ionen im Austausch gegen vorher sorbierte Kationen bzw. Anionen. Je höher die Austauschkapazität für Ionen ist, desto höher ist auch die Pufferung der Böden. Weitere Puffersysteme im Boden sind Gemische schwacher Säuren mit ihren Salzen. Hierzu gehören der Carbonatpuffer sowie in phosphatreichen Böden zusätzlich der Phosphatpuffer. Fehlen freie Carbonate im Boden, dann übernehmen die genannten Kolloide die Pufferung.

Im vorliegenden Versuch wird die Pufferkapazität von drei verschiedenen Böden untersucht. Hierzu werden wässrige Auszüge hergestellt, steigende Mengen an Säure bzw. Lauge zugegeben und die jeweilige pH-Änderung gemessen. Aus dem Verlauf der so ermittelten Titrationskurven kann auf die Pufferkapazität, d.h. die Fähigkeit der Bodensuspension, H^+- bzw. OH^--Ionen abzufangen, geschlossen werden. Gut gepufferte Böden zeigen flachen, schlecht gepufferte steilen Kurvenverlauf. Darüber hinaus sind lineare Kurvenabschnitte ein Zeichen dafür, dass die Pufferkapazität im entsprechenden pH-Bereich nahezu konstant ist, während Krümmungen oder gar Wendepunkte auf Änderungen der Pufferkapazität hinweisen. Steilheit und Form der Pufferungskurven sind abhängig vom Vorhandensein und der Wirkung der verschiedenen Puffersysteme. Dies im Einzelnen zu analysieren, gelingt allerdings nur in besonderen Fällen und mit großem Aufwand.

b) Praktische Durchführung:

Je zwei 10 g-Proben von Sandboden, Kalkboden und Komposterde werden in Bechergläsern mit je 100 ml 0.1 mol/l KCl versetzt und auf einem Magnetrührer zu einer homogenen Suspension vermischt. Sodann wird eine Glaselektrode eingesetzt (Vorsicht beim Rühren!) und der Anfangs-pH-Wert bestimmt (hierzu eventuell mehrere Minuten warten, bis sich der endgültige pH-Wert eingestellt hat!). Der abzulesende pH-Wert muss mindestens 30 sek stabil sein (Stoppuhr!). Bei laufendem Rührwerk werden den Bodenauszügen nun aus einer Bürette **10 ml** 0,05 mol/l HCl in **2 ml**-Portionen zugegeben. Der neue pH-Wert wird ebenfalls erst dann abgelesen und protokolliert, wenn er mindestens 30 sek stabil ist. Nach Ablesen dieses Wertes werden die nächsten 2 ml zugegeben u.s.w. Ebenso verfährt man mit der Zugabe der 0.05 mol/l NaOH zur

Parallelprobe. Als Kontrolle zu den Bodensuspensionen dienen zwei Ansätze ohne Boden, nur mit 100 ml 0.1 mol/l KCl, die in der beschriebenen Weise bearbeitet werden.

Vor dem Praktikum: Erstellen Sie zu diesem Versuch eine Ergebnistabelle.

c) Auswertung:

Die gemessenen pH-**Änderungen** sind gemäß dem Anfangs-pH-Wert und in Abhängigkeit von zugegebener Menge an HCl bzw. NaOH für die drei Böden graphisch darzustellen. Eine gute Übersicht ergibt sich, wenn die verschiedenen Titrationskurven, einschließlich derjenigen für die reinen KCl-Lösungen, zusammen in einem Diagramm aufgetragen werden (Ordinate: pH-Änderung; Abszisse: Menge HCl bzw. NaOH; **1** Graphik!).

Versuch V

TRANSPIRATION UND OSMOTISCHE VORGÄNGE

Zur Thematik des Versuchs siehe:

Campbell, S. 163-181; 895-917; Kutschera, S.33-59; Lüttge et al. S. 67-76; 372-373; 410-418; 448-465; Mengel, S. 218-250; Nultsch, S. 54-60; 259-280; Richter, S. 31-66.

Versuch V/1:

MESSUNG DER SAUGKRAFT VON KARTOFFELPARENCHYM

a) Theoretische Grundlagen:

Die Kraft, mit der eine Pflanzenzelle Wasser aus ihrer Umgebung ansaugt, nennt man Saugkraft. Eine Pflanzenzelle weist nur so lange eine positive Saugkraft auf, wie der osmotische Wert des Zellsaftes nicht vollständig durch den Wanddruck kompensiert ist. Ist letzteres der Fall (z.B. durch längeres Einlegen in Wasser), so wird die Saugkraft = Null und die Zelle kann kein weiteres Wasser mehr aufnehmen; sie ist dann voll turgeszent. Andererseits wird die maximale Saugkraft dann erreicht, wenn die Zellwand vollständig entspannt ist. Die Saugkraft ist also eine aktuelle Größe, die vom jeweiligen Sättigungszustand der Zelle bzw. des Gewebes und Organs mit Wasser abhängt.

Zur Messung der Saugkraft lebender Gewebe wendet man eine „Kompensationsmethode“ an, d.h. man bestimmt, ob ein Gewebe aus verschiedenen Lösungen bekannter Saugkraft (bei Lösungen ist die Saugkraft gleich dem osmotischen Wert) Wasser aufnehmen kann oder Wasser abgibt. Diejenige Lösung, in der Wasser weder aufgenommen noch abgegeben wird, hat die Saugkraft, die der des Gewebes entspricht.

Das Saugvermögen pflanzlicher Gewebe wird heute meist als Wasserpotential Ψ (Psi) oder Ψz bestimmt. Diese thermodynamische Kenngröße ist ein Maß für den Energieinhalt des Wassers in einem System (Zelle, Gewebe, Boden, Atmosphäre) und hat die Dimension eines Drucks (bar oder Pascal bzw. Megapascal, 1 MPa = 10 bar). Das Wasserpotential Ψ_Z der Zelle ist der **negative** Wert der Saugkraft: Wasser wird angesaugt (positiver Wert: Wasser wird ausgepresst). Je niedriger (je stärker negativ) also das Wasserpotential der Zelle, umso höher (positiver) ihre Saugkraft!

Das Wasserpotential stellt analog dem elektrischen Potential die potentielle Energie des Wassers dar. Die Wasserpotentialdifferenz gibt die Unterschiede in der potentiellen Energie des Wassers an. Wenn Wasser sich bewegt, kann es Arbeit leisten. Der Wortbestandteil „Potential“ (lat. potens – kräftig) im Begriff „Wasserpotential“ bezieht sich auf diese potentielle Energie, also auf die Fähigkeit, Arbeit zu leisten, wenn sich Wasser von einer Region mit hohem Ψ in eine Region mit niedrigem Ψ bewegt. Bei reinem Wasser ist die Wasser-„Konzentration“, also die Konzentration der H_2O-Moleküle hoch, dies entspricht hohem Wasserpotential, bei Wasser in Lösungen ist die Wasser-„Konzentration“ niedrig, dies entspricht niedrigem Wasserpotential.
Das Potential reinen Wassers in einem der Atmosphäre ausgesetzten offenen Behälter wird = 0 gesetzt: 0 MPa.
Das Wasserpotential einer Pflanzenzelle setzt sich aus 3 Komponenten zusammen:
Ψπ (in Campbell Ψs) = Potential gelöster Substanzen (= an osmotisch wirksame Teilchen in der Zellvakuole gebundenes Wasser). Steigt die Konzentration gelöster Substanzen im Zellsaft, so nimmt die Saugkraft der Zelle zu, gleichzeitig wird ihr Wasserpotential erniedrigt.
Ψp = Druckpotential oder Turgorpotential (ein hydrostatisches Potential). Es ist ein Wasserpotential, das durch Druck erzeugt wurde, wie Wasser in einer Pipette, das durch Druck auf das Gummihütchen herausgespritzt werden kann: erhöht man den Druck, wird auch Ψp erhöht.
Ψτ = Matrixpotential (= oberflächengebundenes Wasser). Hier handelt es sich um Wasser, das an Zellwandbestandteile, an Zelloberflächen, an Proteine u.a. gebunden ist.
Die Wasserpotentialgleichung ist nun folgendermaßen zu formulieren:
Das Wasserpotential der Zelle (Ψz) ist gleich dem Potential gelöster Substanzen (Ψπ, negativer Wert, weil Wasser in Lösungen „weniger verfügbar“ ist, Lösungen „halten ihr Wasser fest“) plus dem Druck- oder Turgorpotential (Ψp, positiver Wert, hydrostatischer Druck, er hat die Tendenz, Wasser fortzubewegen), erweitert um ein matrikales Potential oder Quellungspotential (Ψτ, negativer Wert, da an Oberflächen bzw. an Quellkörper gebundenes Wasser ebenfalls „weniger verfügbar“ ist).
Wasserpotentialgleichung: Ψz = Ψπ (-) + Ψp (+) + Ψτ (-)
Je stärker erniedrigt, also je stärker negativ das Wasserpotential der Zelle ist, umso höher (positiver!) ist ihre Saugkraft. Das Wasserpotential einer voll turgeszenten, wassergesättigten Zelle ist gleich 0.

Ob und in welche Richtung Wasser zwischen 2 Lösungen bewegt wird, hängt nicht davon ab, **welche** Substanzen in Wasser gelöst sind, sondern nur davon, **wie viel** gelöste Substanzen das Wasser enthält, also wie viele Teilchen (Moleküle oder Ionen) in Wasser gelöst sind.
Eine 1-molare Lösung einer beliebigen Substanz, die nicht dissoziiert ist, hat bei 0 °C ein Wasserpotential von -22,7 bar oder 2,27 MPa.
Äquimolare Lösungen verschiedener nicht-dissoziierender Substanzen haben demnach gleiche $\Psi\pi$-Werte: Sie sind isotonisch (iso, gr. - gleich; tonos, gr. - Druck).

b) Praktische Durchführung:

Lösungen:

Vor dem Praktikum berechnen:

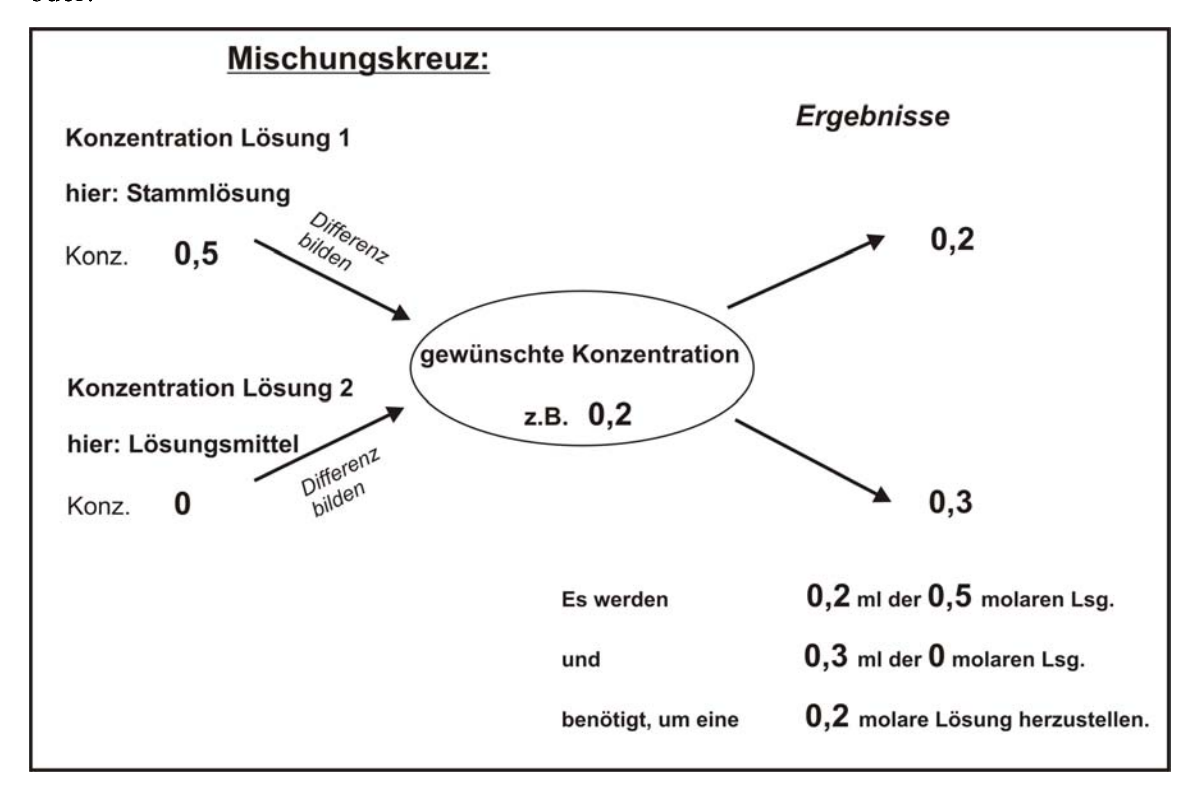
In einem 100 ml-Messkolben wird eine 0.5 molare Saccharose-Stammlösung angesetzt (M = 342,30 g/mol). Welche Menge an Saccharose muss eingewogen werden? (Als Hilfe kann man das u.a. Mischungskreuz oder die Formel $V_1 = c_2 \times V_2 / c_1$ benutzen.)
Aus dieser Stammlösung werden die folgenden Konzentrationen durch Verdünnen in 25 ml-Messkolben hergestellt (**ml berechnen!**):

Endkonzentration (mol/l), Endvolumen 25 ml	*ml Stammlösung (0,5 M)*	*ml H_2O deion.* -kann auf 25 ml aufgefüllt werden
0,10 M		-
0,20 M		-
0,25 M		-
0,30 M		-
0,35 M		-
0,40 M		-

Als Hilfe:

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1}$$

oder:



Die jeweils benötigte Menge der Stammlösung wird mit 5- bzw. 10 ml-Messpipetten in die Messkolben übertragen und diese bis zur Markierung mit H_2O deion. aufgefüllt. Messkolben verschließen und Lösungen gut durchmischen!

Lösungen zur Verwendung in Versuch V/2 aufbewahren.

Versuch:

Vor dem Praktikum: Tabelle für die Gewichtsermittlung der Kartoffelstücke erstellen.

In 6 Reagenzgläser werden (mit Hilfe einer Vollpipette) **je 10 ml** folgender Saccharoselösungen (**0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,5 mol/l**) pipettiert, in ein siebtes 10 ml H_2O deion. zur Kontrolle.

Aus einer Kartoffel werden ca.130 (s.u.) Zylinder mit 5 mm Durchmesser gestanzt (Korkbohrer) und in 5 mm lange Abschnitte geschnitten. Diese werden in eine kleine Petrischale gelegt, die ihrerseits in eine große, mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegte Schale gestellt wird (feuchte Kammer - Verdunstungsschutz). Zu Versuchsbeginn werden Kartoffelstückchen entnommen, vorsichtig mit weichen

Zellstofftüchern abgetupft und zu **7 Proben à 2 g** (~15-20 Stück) abgewogen (**das exakte Gewicht notieren!**).

6 Proben werden in die Saccharose-Lösungen, 1 Probe in die Wasserkontrolle gebracht und während des Versuchs mehrmals durchmischt. Nach 2 h werden die Kartoffelstückchen herausgenommen, nochmals zwischen Zellstofftüchern vorsichtig (ohne Druck) abgetupft und erneut gewogen.

c) Auswertung:

In einem Diagramm ist die Differenz der Gewichtszu- bzw. -abnahme der Kartoffelstückchen (Ordinate) in Abhängigkeit von der Molarität der Zuckerlösungen (Abszisse) darzustellen. Die Kurve, die durch die Messpunkte gezeichnet wird, schneidet die Abszisse bei jener Konzentration, bei der keine Gewichtsveränderung eingetreten wäre, ihre Saugkraft also der des Kartoffelparenchyms entspricht. Die Saugkraft ist der Sog, mit dem Wasser osmotisch in die Vakuole einströmt! Aus der beigefügten Tabelle kann anhand der im Versuch ermittelten molaren Konzentration der entsprechende Druck (in bar) abgelesen werden. Um die Saugkraft als Wasserpotential zu kennzeichnen, ist der errechnete Druck nur mit negativem Vorzeichen zu versehen.

Tabelle zu den Versuchen V/1 und V/2:

Osmotischer Druck von Saccharose-Lösungen (aus Metzner 1982)

mol/l	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	0,00	0,26	0,54	0,80	1,07	1,34	1,61	1,87	2,14	2,41
0,1	2,67	2,95	3,21	3,48	3,75	4,01	4,28	4,54	4,81	5,08
0,2	5,36	5,64	5,94	6,22	6,51	6,79	7,07	7,37	7,65	7,94
0,3	8,24	8,53	8,83	9,12	9,41	9,71	10,00	10,30	10,62	10,94
0,4	11,26	11,58	11,90	12,22	12,53	12,86	13,18	13,51	13,84	14,18
0,5	14,50	14,83	15,16	15,49	15,85	16,20	16,57	16,93	17,29	17,65
0,6	18,01	18,37	18,75	19,11	19,49	19,86	20,24	20,61	20,99	21,37
0,7	21,77	22,16	22,56	22,95	23,35	23,74	24,15	24,59	25,01	25,44
0,8	25,87	26,30	26,72	27,15	27,55	27,96	28,36	28,77	29,17	29,68
0,9	30,09	30,59	31,10	31,50	32,01	32,52	33,02	33,53	34,04	34,54
1,0	35,05	35,56	36,16	36,67	37,18	37,68	38,19	38,70	39,30	39,81
1,1	40,32	40,93	41,43	42,04	42,55	43,05	43,66	44,27	44,77	45,38
1,2	45,99	46,60	47,21	47,81	48,42	49,03	49,64	50,24	50,95	51,56
1,3	52,27	52,88	53,59	54,30	55,01	55,61	56,32	57,03	57,74	58,45
1,4	59,16	59,87	60,68	61,39	62,10	62,91	63,62	64,43	65,14	65,85
1,5	66,66	67,36	68,17	68,99	69,80	70,61	71,52	72,43	73,44	74,05
1,6	74,86	75,77	76,68	77,49	78,41	79,32	80,23	81,24	82,26	83,17
1,7	84,08	85,09	86,11	87,12	88,13	89,14	90,16	91,27	92,28	93,40
1,8	94,41	95,53	96,64	97,75	98,87	99,98	101,20	102,31	103,53	104,64
1,9	105,86	107,07	108,29	109,51	110,62	111,73	112,95	114,17	115,48	116,70

Alle Angaben (für 20°C) in bar.

Beispiel für die Benutzung der Tabelle:

Der osmotische Druck einer 0,22 molaren Saccharoselsg. entspricht einem osmotischen Wert von 5,94 bar, bzw. einem Wasserpotential Ψz von -5,94 bar.

Versuch V/2:

MESSUNG DES OSMOTISCHEN WERTES DURCH GRENZPLASMOLYSE

a) Theoretische Grundlagen:

Der osmotische Wert einer Lösung hängt von der Zahl der darin gelösten Teilchen ab. Die Messung des osmotischen Werts ist durch die physikalische Methode der Kryoskopie (= Messung der Gefrierpunktserniedrigung) möglich; dazu braucht man jedoch einige ml Zellsaft, die man durch Auspressen von sehr vielen Zellen, also eines größeren Gewebestücks, gewinnen kann. Will man den osmotischen Wert von wenigen bestimmten Zellen messen, so bedient man sich der Methode der Grenzplasmolyse, die auf folgenden Überlegungen beruht:

Die Netto-Saugkraft der Zelle ist gleich 0, wenn keine Wandspannung, kein Turgordruck mehr vorhanden ist. Dies ist dann sicher der Fall, wenn sich der Protoplast gerade von der Wand abhebt, also bei **Grenzplasmolyse**. Legt man Gewebestückchen in verschieden konzentrierte Lösungen und prüft nach einer genügend langen Zeit, in welcher der Lösungen gerade Grenzplasmolyse eingetreten ist, dann gilt bei dieser Konzentration:

Saugkraft der Außenlösung = Saugkraft der Zelle = Osmotischer Wert

Der osmotische Wert des Zellinhalts ist also gleich dem der Außenlösung, Zellinhalt und Außenlösung sind **isotonisch**.
Grenzplasmolyse kann man bei Geweben, deren Zellen eine gefärbte Vakuole (z. B. durch Anthocyane) besitzen, leicht erkennen.
Bei Anwendung des Wasserpotentialkonzepts auf die osmotischen Verhältnisse der Zelle tritt an die Stelle des osmotischen Werts bzw. des dazu proportionalen potentiellen osmotischen Drucks das Potential gelöster Teilchen $\Psi\pi$. Dessen Wert ist numerisch gleich demjenigen des osmotischen Drucks, hat aber im Unterschied zu diesem ein negatives Vorzeichen.
Im Zustand der Grenzplasmolyse wird das Wasserpotential der Zelle ausschließlich durch das Potential gelöster Teilchen $\Psi\pi$ und das Matrixpotential $\Psi\tau$ bestimmt:
$\Psi z = \Psi\pi + \Psi\tau$.

Die mit dem Wasseraustritt verbundene Volumenabnahme führt zunächst zu einer Entspannung der gedehnten Zellwand ($\Psi_P = 0$). Ist diese ganz entspannt, dann löst sich der Protoplast bei weiterer Vakuolenverkleinerung von der Zellwand ab. Dieser Vorgang wird als „Plasmolyse“ bezeichnet. Den Zustand, in dem der Protoplast gerade beginnt, sich von der Zellwand abzuheben, bezeichnet man als „Grenzplasmolyse“.

Hypertonische Außenlösung: $\Psi\pi_{(Außenlösung)} < \Psi\pi_{(Zellsaft)}$ → Plasmolyse
Hypotonische Außenlösung: $\Psi\pi_{(Außenlösung)} > \Psi\pi_{(Zellsaft)}$ → Deplasmolyse

Wird das hypertonische Außenmedium durch ein hypotonisches ersetzt, dann nehmen Protoplast und Vakuole wieder osmotisch Wasser auf, die Plasmolyse wird rückgängig gemacht: **Deplasmolyse**.
Plasmolysierbar sind nur lebende Zellen, da nur sie selektiv permeable Membranen besitzen. Die Plasmolysierbarkeit ist deshalb ein Test für die Lebensfähigkeit einer Zelle.
Mit Hilfe der Plasmolyse kann das Potential $\Psi\pi$ des Zellsaftes bestimmt werden. Dazu ermittelt man **die** Außenlösungskonzentration, die gerade noch bei 50% der Zellen des untersuchten Gewebes Grenzplasmolyse herbeiführt.

b) Praktische Durchführung:

Vor dem Praktikum: Tabelle für die Anzahl der plasmolysierten Zellen vorbereiten.

Versuchspflanze: *Rhoeo discolor*, Commelinaceae

In 8 kleine Petrischalen werden **je 5 ml** Saccharoselösungen der Konzentrationen **0,1; 0,2; 0,25; 0,3; 0,35; 0,4; 0,5 mol/l** (Herstellung der Lösungen siehe Versuch V/1) bzw. 5 ml H_2O deion. (Kontrolle) gefüllt. Von der Blattunterseite (nicht Blattrippe!) von *Rhoeo discolor* werden mit einer scharfen Rasierklinge Flächenschnitte mit mindestens 50 intakten Epidermiszellen angefertigt (bei Kontrolle unter dem Mikroskop daran erkennbar, dass die Vakuolen noch durch Anthocyane gefärbt, also unverletzt sind). Zu Versuchsbeginn werden jeweils 5 geeignete Schnitte mittels einer Pinzette **mit der Schnittfläche nach unten** in die verschiedenen Lösungen gelegt; (beginnend mit der

niedrigsten Konzentration; jeweils in 10 minütigen Abständen). Die Petrischalen werden verschlossen und der Zeitpunkt protokolliert!
Nach 30 min werden die Schnitte, wiederum mit der Schnittfläche nach unten, **in einem Tropfen der jeweiligen Saccharoselösung** bzw. die 8. Probe in H_2O deion. zwischen Objektträger und Deckglas gebracht. Unter dem Mikroskop wird durch Auszählen von jeweils 50 Zellen ermittelt, wie hoch der Prozentsatz der plasmolysierten Zellen ist. Am Schnittrand liegende Zellen dürfen nicht mitgezählt werden, da sie durch den Wundreiz pathologisch beeinflusst sind.

c) Auswertung:

Der Prozentsatz plasmolysierter Zellen (Ordinate) wird in ein Diagramm gegen die Konzentration der Rohrzuckerlösungen (Abszisse) aufgetragen. Der Schnittpunkt der Kurve mit der 50%-Linie stellt den gesuchten Grenzplasmolysewert dar. Er entspricht dem durchschnittlichen osmotischen Wert der Zellen. Anhand der beigefügten Tabelle (siehe Versuch V/1) kann die ermittelte molare Konzentration in den zugehörigen osmotischen Druck und in das entsprechende Potential gelöster Teilchen $\Psi\pi$ (Vorzeichen beachten), beide mit der Einheit bar, umgerechnet werden.

Versuch V/3:

NACHWEIS DER WASSERDAMPFABGABE DURCH SPALTÖFFNUNGEN

Theoretische Grundlagen der stomatären Transpiration:

Wasserdampfabgabe und Gasaustausch sind durch die Spaltöffnungen aktiv regulierbar.

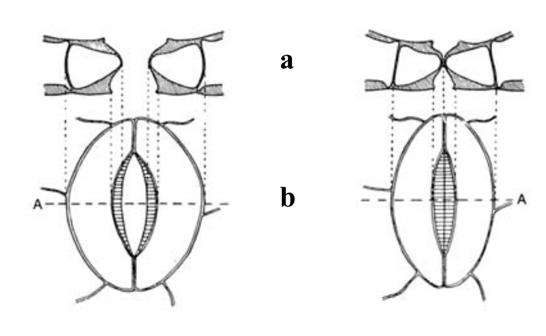


Abb.9: Geöffnete bzw. geschlossene Spaltöffnung; schematisch; Querschnitt (a) bzw. Aufsicht (b)
(nach HESS: „Pflanzenphysiologie“, 10. Auflage)

Die Funktion der Spaltöffnungen ergibt sich durch den Aufbau der Schließzellen. Mit steigendem Turgor werden die Rückenwand und ein kleiner Teil der Vorderwand als einzige nicht verdickte Wandbereiche der Schließzelle gedehnt. Da die dem Spalt zugekehrten Wände wegen ihrer Verdickungsleisten der Dehnung nicht folgen können, krümmen sich die Schließzellen nach ihrer Rückenseite und es öffnet sich ein Spalt. Umgekehrt führt eine Turgorabnahme zu einer Entspannung der Rückenwände und somit zur Entkrümmung der Schließzellen, folglich zum Spaltenschluss.

Die Verteilung der Stomata hängt von den jeweiligen Blatttypen ab. Vorwiegend befinden sie sich in der Epidermis der Blattunterseite (**hypostomatisch**), weniger häufig in der Epidermis beider Blattseiten (**amphistomatisch**), bei Schwimmblättern nur auf der Blattoberseite (**epistomatisch**).
Die Anzahl der Spaltöffnungen kann zwischen 100 und 1000/mm^2 Blattfläche betragen. Dadurch erreicht die stomatäre Transpiration Werte von 80-90% der Evaporation.

Mit folgendem Versuch kann die stomatäre Transpiration auf einfache Weise veranschaulicht werden. Er basiert auf einer einfachen Farbreaktion eines Indikators, in diesem Fall Kobaltchlorid ($CoCl_2$), der sich bei zunehmender Feuchtigkeit von blau nach rosa verfärbt.

Reaktionsgleichung:

$$Co^{2+} + 6\ H_2O \longrightarrow Co[(H_2O)_6]^{2+}$$

trocken ⟶ feucht
blau ⟶ rosa

Pflanzenmaterial:

a) hypostomatische Blätter von
Prunus laurocerasus, Rosaceae, Kirschlorbeer; oder
Parthenocissus tricuspidata, Vitaceae, Wilder Wein

b) amphistomatische Blätter von
Bergenia crassifolia bzw. B. stracheyi, Saxifragaceae, Bergenie

Sonstige Materialien und Geräte:

2 Glasplättchen ~50x50 mm mit aufgeklebten Dichtungsringen (∅ 40 mm), (siehe Abb.), 2 Klammern, Schere, Präparierbesteck, Trockenschrank, Mikroskop

Chemikalien:

Kobaltpapier (Herstellung: runde Scheibchen ∅ 40 mm aus Filterpapier ausschneiden, in Kobaltchloridlösung ($CoCl_2$, 5%ig), legen und anschließend bei 90 °C im Trockenschrank trocknen, bis sie tiefblau geworden sind; trocken aufbewahren).

Durchführung:

Die Kobaltpapierscheibchen werden in Dichtungsringen, bedeckt mit Glasplättchen, auf der Blattober- und -unterseite befestigt; (siehe Abb.). Mit Hilfe von Klammern werden sie soweit zusammengedrückt, dass die Kobaltpapierscheibchen ohne Quetschen der Blätter luftdicht eingeschlossen sind.

Nach 20 min -1 h (je nach Temperatur und Sonnenlicht) kann man eine Rosafärbung des Kobaltpapiers bei *Prunus laurocerasus* bzw. bei *Parthenocissus tricuspidata* auf der Blattunterseite beobachten, während das Papier auf der Blattoberseite zum gleichen Zeitpunkt noch deutlich blau ist. Dagegen färbt sich das Kobaltpapier bei *Bergenia* sowohl auf der Blattunterseite als auch auf der Blattoberseite rosa.

Zur Veranschaulichung werden von beiden Blatttypen jeweils Flächenschnitte von der Blattober- und der Blattunterseite angefertigt und im Mikroskop betrachtet. Die

Beobachtungen werden im Protokoll notiert, von diesen 4 Schnitten eine **schematische** Skizze angefertigt und dem Protokoll **(sowie später dem Bericht)** beigelegt.

Versuchsaufbau:

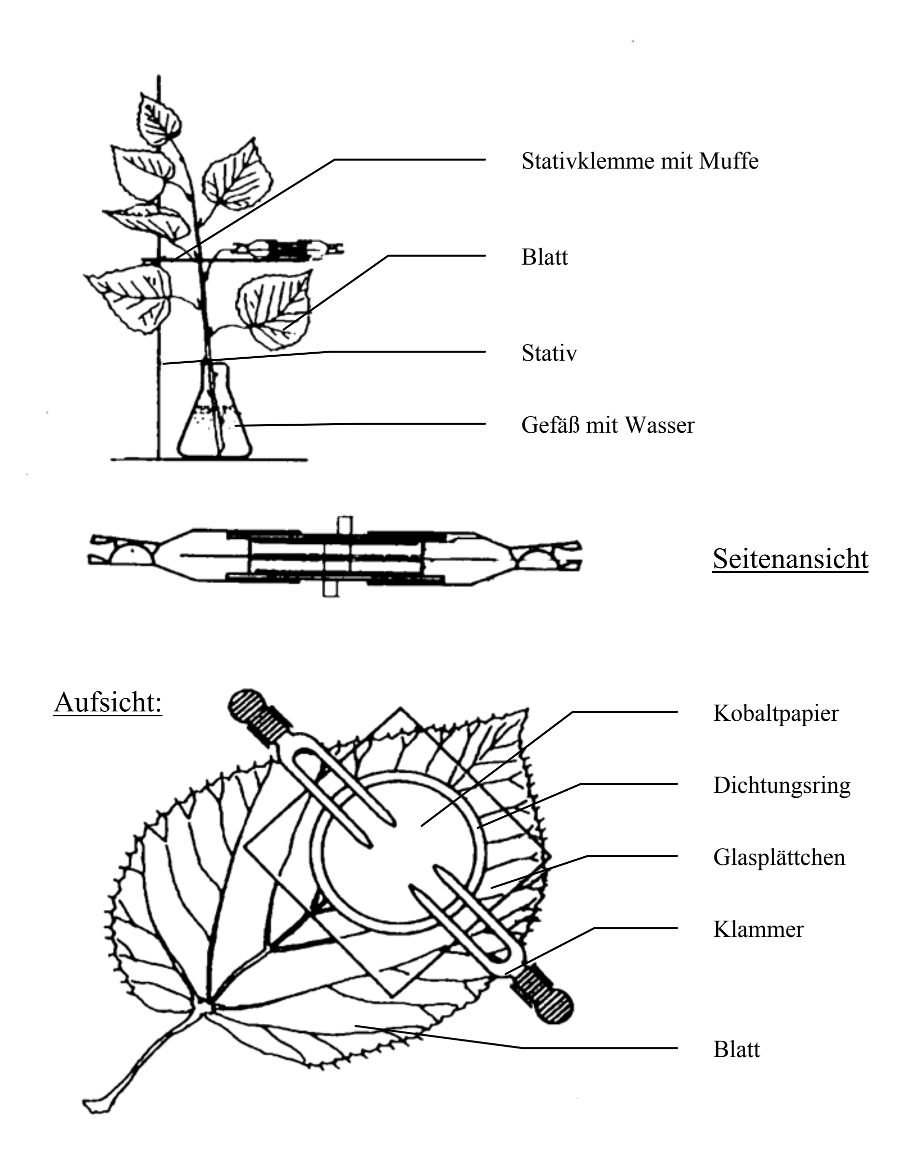


Abb. 10: Aufbau zu Versuch V/3

Versuch V/4:

MESSUNG DER TRANSPIRATION IM POTOMETER

a) Theoretische Grundlagen:

Ein feuchter Körper gibt infolge der Saugkraft der Luft $\Psi_{Luft} < \Psi_{feuchter\ Körper}$ Wasserdampf an die Umgebung ab. Das Gleiche gilt für Pflanzen, aus deren wasserdampfgesättigten Interzellularen Wasserdampf in die umgebende, nicht dampfgesättigte Luft diffundiert. Diese als Transpiration bezeichnete Wasserdampfabgabe der Pflanzen wird der Evaporation, d.h. der Wasserdampfabgabe einer freien Wasserfläche, gegenübergestellt. Bei gleicher Verdunstungsfläche kann die Transpiration bis zu 80-90% der Evaporation erreichen. Die Höhe der pflanzlichen Transpiration wird bestimmt durch eine physikalische Komponente, bei der die Wasserabgabe nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten erfolgt wie die eines physikalischen Systems, und durch eine physiologische Komponente, die dem physikalischen Teil der Transpiration überlagert ist.

Die physikalische Komponente kann mit einfachen Mitteln an Modellversuchen untersucht werden (Gipspilz). Für sie sind alle Faktoren von Bedeutung, die das Sättigungsdefizit Pflanze-Luft bestimmen: der Wasserdampfgehalt der Atmosphäre, die Temperatur der umgebenden Luft, die Temperatur des Wasser abgebenden Körpers, Sonneneinstrahlung, welche die Temperatur beider ändert, und nicht zuletzt die herrschenden Windgeschwindigkeiten, die die Transpiration durch das Wegblasen der Dampfhauben von den untersuchten Organen beschleunigen. Zur Bestimmung der physiologischen Komponente bedarf es der Untersuchung der Pflanzen unter verschiedenen äußeren Bedingungen und physiologischen Zuständen. Hier ist besonders das Verhalten der Stomata auf Licht, Wassergehalt und Temperatur der Umgebung, die Saugkraft sowie Bau und Alter der Pflanzen von Bedeutung. Die Wasseraufnahme der Pflanzen, die u. a. von der Temperatur des Bodens abhängig ist, reguliert indirekt ebenfalls die Wasserabgabe.

Die insgesamt messbare Transpiration setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, der **cuticulären** Transpiration durch Epidermis, Haare und deren Cuticula und der **stomatären** Transpiration mit Hilfe der Spaltöffnungen. Erstere hängt in ihrer Höhe weitgehend von der Ausbildung der Epidermis und der Cuticula ab (Wanddicke, Cutineinlagerung, cutinisierte Schicht, Behaarung, Wachsschicht) und ist somit nur von den unterschiedlichen äußeren physikalischen Bedingungen abhängig. Die stomatäre

Transpiration ist dagegen von der Pflanze durch Öffnen und Schließen der Spaltöffnungen regulierbar; sie macht bei den meisten einheimischen Pflanzen bis ca. 80-90% der Gesamttranspiration aus (siehe auch Versuch V/3).

Die Transpiration ist für die Pflanze lebensnotwenig, da sie die treibende Kraft des Wasserstroms ist, der von der Wurzel bis in die höchsten Teile der Pflanze im Xylem der Leitbündel über weite Strecken der Schwerkraft entgegenläuft und für die Verteilung der in der Wurzel aufgenommenen Mineralsalze in den oberirdischen Pflanzenteilen sorgt. Ausschlaggebend für den Antrieb dieses auch als „Transpirationsstrom“ bezeichneten Wassertransports ist die saugende Wirkung der Transpiration der oberirdischen Pflanzenteile, insbesondere der Blätter. Von hier aus pflanzt sich der Transpirationssog über die Leitbahnen des Xylems bis in die Wurzel, wahrscheinlich sogar bis zur Wurzeloberfläche fort, wobei das Abreißen der in den kapillaren Gefäßen nach oben wandernden Wasserfäden infolge der starken Kohäsionskräfte zwischen den Wassermolekülen sowie durch die Adhäsion des Wassers an die Gefäßwände verhindert wird (Kohäsionstheorie der Wasserleitung). Zur Bewerkstelligung des Transpirationsstroms muss die Pflanze keine eigene Energie aufwenden. Sie nutzt hierzu die Wasserpotentialdifferenz zwischen Boden und Atmosphäre aus. Funktionell steht die Pflanze zwischen dem fast wassergesättigten Bodenraum (hohes Wasserpotential) und dem nicht wasserdampfgesättigten Luftraum (niedriges Wasserpotential).

Das Wasserpotential der Pflanze liegt in Bereichen von -10 bis -30 bar, das der Atmosphäre um -940 bar bei 50% rel. Luftfeuchte, das hohe Wasserpotential des Bodens zwischen 0 und -1 bar. Bemerkenswert ist weiterhin, dass das Wasserpotential innerhalb der Pflanze von den Wurzeln bis zu den Blättern von -2 bis -4 bar auf -5 bis -25 bar absinkt, wobei die Werte in der Tracheenflüssigkeit der Sprossachse von Angiospermen zwischen -5 und -15 bar liegen.

Die Messung der Transpiration erfolgt entweder durch Bestimmung der Wasserabgabe mit Hilfe einer Wägung oder, wie im vorliegenden Versuch, durch Messung der Wasseraufnahme mit Hilfe eines Potometers. Im letzteren Fall wird die am Potometer volumetrisch gemessene Wasseraufnahme gleich der Wasserdampfabgabe durch Transpiration gesetzt. Erlaubt ist dieses Vorgehen, weil sich bei Wasserbilanzmessungen gezeigt hat, dass die Werte für Wasseraufnahme und -abgabe im Allgemeinen gleich sind.

b) Praktische Durchführung:

Vor dem Praktikum: Tabelle vorbereiten zur Messung des Meniskusstandes in Abhängigkeit von der Zeit

Das Potometer (lat. potare – trinken, gr. métron – das Maß, Gerät zur Messung der Wasseraufnahme von Pflanzen) wird mit abgestandenem Leitungswasser bis zum Gefäßrand so gefüllt, dass auch die seitliche Kapillare luftblasenfrei ist. Der zu verwendende Kirschlorbeerzweig (*Prunus laurocerasus*) wird einige Stunden vor Versuchsbeginn abgeschnitten und am Arbeitsplatz in Leitungswasser gestellt. Etwa 1 Stunde vor Versuchsbeginn wird der Zweig unter Wasser noch einmal gekürzt und dann mit Hilfe eines durchbohrten Gummistopfens im Potometer luftdicht und luftblasenfrei befestigt (gegebenenfalls mit Vakuumfett abdichten). Der Stand des Wassermeniskus in der Kapillare wird markiert und sein Rückgang unter verschiedenen Bedingungen jeweils 40 min lang im 10-Minuten-Abstand an der Millimeter-Skala abgelesen. Bedingungen: ruhende Luft und Wind, der mit einem Ventilator erzeugt wird. Aus der gemessenen Wegstrecke des Wassermeniskus lässt sich mit Hilfe des Eichwertes der Kapillare die von der Pflanze jeweils aufgenommene Wassermenge (in µl angeben) errechnen.
Gleichzeitig werden relative Luftfeuchtigkeit und Temperatur (Thermohygrometer) sowie die Windgeschwindigkeit (Schalenkreuz-Windmesser) gemessen und notiert.

c) Auswertung:

In **einem** Diagramm soll die Wasseraufnahme (in µl, als Maß für die transpirierte Wassermenge; Ordinate) für ruhende Luft und Wind gegen die Zeit (in min; Abszisse) auftragen werden.

Teilversuch:

Wie schnell der Wassertransport (Transpirationsstrom) in den Blattadern erfolgen kann, lässt sich durch folgenden einfachen Versuch ermitteln:

Versuchspflanzen:

Weiß blühende Pflanzen, z.B. im Frühjahr *Stiefmütterchen* (*Viola tricolor), Hornveilchen (Viola spec.)* oder *Buschwindröschen (Anemone nemorosa)*; im Herbst Japan-Anemone (*Anemone japonica)* oder eine andere Art, die im Zeitraum der Versuchsdurchführung gerade blüht.

Durchführung:

Eine Blüte mit Blütenstiel wird frisch gekürzt, die Länge des Blütenstiels vermessen und notiert und dann in ein Gefäß mit 10%iger saurer Fuchsin-Lösung gestellt.
Nach einiger Zeit färben sich vom Blütenstiel her die Adern der Blütenkron- **bzw.** Perigonblätter rot. Die Geschwindigkeit des Farbstofftransports soll im Blütenstiel **und** im Kron- bzw. Perigonblatt ermittelt und in **Meter pro Stunde** angegeben werden.